

Immunmodulation der IgE-Produktion durch autokrine Calcitriol-Synthese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Juliane Lindner

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. rer. nat. Kai Matuschewski
 2. Prof. Dr. rer. nat. Susanne Hartmann
 3. Prof. Dr. med. Margitta Worm

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Inhaltsverzeichnis | II |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| 2 Summary | 3 |
| 3 Einleitung | 5 |
| 3.1 IgE-vermittelte Typ I–Allergien | 5 |
| 3.1.1 T-Zell-abhängige Sensibilisierung | 5 |
| 3.1.2 Allergien – Ergebnis einer fehlgeleiteten Immunantwort, die ursprünglich dem Schutz vor Parasiten diene? | 6 |
| 3.2 Der Nematode <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 7 |
| 3.2.1 Lebenszyklus des Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 8 |
| 3.2.2 Immunantwort auf die Infektion mit dem Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 9 |
| 3.2.3 Exkretorische und sekretorische Produkte des Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 10 |
| 3.3 Vitamin D | 11 |
| 3.3.1 Biosynthese von Vitamin D | 11 |
| 3.3.2 Der Vitamin D-Rezeptor | 12 |
| 3.3.3 Wirkungsweise von Vitamin D | 15 |
| 3.4 Vitamin D und Allergie | 18 |
| 3.5 Knockout des <i>Cyp27b1</i> -Gens – ein Mausmodell für Vitamin D-Defizienz | 19 |
| 4 Ziele der Arbeit | 21 |
| 5 Material und Methoden | 22 |
| 5.1 Material | 22 |
| 5.1.1 Chemikalien und Reagenzien | 22 |
| 5.1.2 Puffer und Lösungen | 24 |
| 5.1.3 Antikörper und Enzyme | 26 |
| 5.1.4 Kits | 28 |
| 5.1.5 Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 5.1.6 Laborgeräte | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1.7 | Software..... | 31 |
| 5.2 | Methoden..... | 32 |
| 5.2.1 | Zellbiologische Methoden | 32 |
| 5.2.2 | Molekularbiologische Methoden | 33 |
| 5.2.3 | Immunologische Methoden..... | 37 |
| 5.2.4 | Tierexperimentelle Arbeiten | 41 |
| 5.2.5 | Parasitologische Methoden..... | 46 |
| 5.2.6 | Statistische Auswertung..... | 47 |
| 6 | Ergebnisse..... | 48 |
| 6.1 | Expression von Cyp27b1, VDR und Cyp24a1 bei murinen B- und T- Lymphozyten | 48 |
| 6.2 | Verlauf der humoralen Immunantwort in einem Vitamin D-defizienten Maus-Modell | 52 |
| 6.2.1 | Humorale Immunantwort nach Sensibilisierung mit Ovalbumin | 52 |
| 6.2.2 | Allergen-spezifisches Immunglobulinprofil nach Sensibilisierung mit Ovalbumin..... | 53 |
| 6.3 | Einfluss der Vitamin D ₃ -Supplementierung auf die Bildung autoreaktiver Antikörper | 56 |
| 6.4 | Charakterisierung der Vitamin D-defizienten Cyp27b1 ^{-/-} -Mäuse | 60 |
| 6.4.1 | Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D ₃ und 1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃ im Blutplasma von Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen | 60 |
| 6.4.2 | Körpermasse | 61 |
| 6.4.3 | Durchflusszytometrische Analyse der Leukopoese | 62 |
| 6.5 | Verlauf der Infektion mit dem Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus</i> <i>bakeri</i> in einem Vitamin D-defizienten Mausmodell | 64 |
| 6.5.1 | Humorale Immunantwort nach Infektion mit dem Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 64 |
| 6.5.2 | Spezifisches Immunglobulinprofil nach Infektion mit dem Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 66 |
| 6.5.3 | Ausgang der Infektion mit dem Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus</i> <i>bakeri</i> bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen..... | 68 |
| 7 | Diskussion | 73 |
| 7.1 | Der Knockout des Cyp27b1-Gens bei Mäusen führt zu einer gesteigerten humoralen IgE-Immunantwort | 73 |

| | | |
|------|---|-----|
| 7.2 | Der Knockout des <i>Cyp27b1</i> -Gens bei Mäusen beeinflusst die Leukopoese im Knochenmark und begünstigt das Auftreten autoreaktiver Antikörper gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene | 78 |
| 7.3 | Der Knockout des <i>Cyp27b1</i> -Gens bei Mäusen führt zu einer erhöhten IgE-Produktion, die jedoch keinen Einfluss auf die Abwehr des Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> hat..... | 84 |
| 8 | Literatur..... | 91 |
| 9 | Danksagung | 116 |
| 10 | Selbstständigkeitserklärung..... | 118 |
| 11 | Anhang | 119 |
| 11.1 | Nachweis aktivierter B- und T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie | 119 |
| 11.2 | Gegenüberstellung verschiedener Subpopulationen des Immunsystems von <i>Cyp27b1</i> ^{+/+} - und <i>Cyp27b1</i> ^{-/-} -Mäusen | 122 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| Abb. 1: | Entstehung einer Typ I-Allergie. | 6 |
| Abb. 2: | Lebenszyklus des Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 8 |
| Abb. 3: | Metabolismus von Calcitriol und dessen chemische Struktur. | 12 |
| Abb. 4: | Molekularer Mechanismus der genomischen Wirkung des nukleären Vitamin D-Rezeptors. | 14 |
| Abb. 5: | Versuchsablauf der T-Zell-abhängigen Sensibilisierung. | 44 |
| Abb. 6: | Versuchsablauf der Infektion mit dem Nematoden <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> | 46 |
| Abb. 7: | Expression der mRNA von <i>Cyp27b1</i> , <i>Vdr</i> und <i>Cyp24a1</i> bei CD19 ⁺ B-Lymphozyten. | 49 |
| Abb. 8: | Expression der mRNA von <i>Cyp27b1</i> , <i>Vdr</i> und <i>Cyp24a1</i> bei CD4 ⁺ T-Lymphozyten. | 50 |
| Abb. 9: | Proteinexpression von CYP27B1 und VDR bei CD19 ⁺ B- und CD4 ⁺ T-Lymphozyten. | 51 |
| Abb. 10: | Verlauf der humoralen Immunantwort bei OVA-sensibilisierten Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen. | 53 |
| Abb. 11: | Verlauf der antigenspezifischen Immunglobulinwerte bei OVA-sensibilisierten Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen. | 55 |
| Abb. 12: | Nachweis autoreaktiver Antikörper gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene im Blutplasma von Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D ₃ -Supplementierung. | 57 |
| Abb. 13: | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung autoreaktiver Antikörper gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene im Blutplasma von Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D ₃ -Supplementierung. | 58 |
| Abb. 14: | Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D ₃ im Blutplasma von Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D ₃ -Supplementierung. | 59 |
| Abb. 15: | Konzentration der Vitamin D ₃ -Metabolite 25-Hydroxyvitamin D ₃ und 1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃ im Blutplasma von Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen. | 61 |
| Abb. 16: | Gegenüberstellung der Körpermasse von Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen. | 61 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 17: Vergleich der Gesamtzellzahlen von Knochenmark, Thymus, Milz und Peritoneum von Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen..... | 62 |
| Abb. 18: Abweichende Leukozyten-Subpopulationen bei Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen..... | 63 |
| Abb. 19: Verlauf der humoralen Immunantwort bei <i>H.p. bakeri</i> -infizierten Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen. | 66 |
| Abb. 20: Verlauf der spezifischen Immunglobulinantworten bei <i>H.p. bakeri</i> -infizierten Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäusen..... | 68 |
| Abb. 21: Anzahl der Nematodeneier in den Faeces <i>H.p. bakeri</i> -infizierter Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäuse. | 70 |
| Abb. 22: Anzahl der Nematoden im Dünndarm <i>H.p. bakeri</i> -infizierter Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäuse am Versuchstag 90..... | 71 |
| Abb. 23: Fekundität der weiblichen <i>H.p. bakeri</i> isoliert aus dem Dünndarm infizierter Cyp27b1 ^{+/+} - und Cyp27b1 ^{-/-} -Mäuse. | 72 |
| | |
| Anhang Abb. I: Gating-Strategie zur Auswertung der Aktivierungsmarker stimulierter B- und T-Lymphozyten. | 119 |
| Anhang Abb. II: Median der Fluoreszenzintensität (MFI) unstimulierter und stimulierter B220 ⁺ B-Lymphozyten. | 120 |
| Anhang Abb. III: Median der Fluoreszenzintensität (MFI) unstimulierter und stimulierter CD4 ⁺ T-Lymphozyten. | 121 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------------|---|-----|
| Tabelle 1: | Zusammensetzung eines Ansatzes für die cDNA-Synthese. | 34 |
| Tabelle 2: | Aufbau des PCR-Programms für die cDNA-Synthese. | 34 |
| Tabelle 3: | Zusammensetzung eines Ansatzes für die quantitative Real-Time-PCR. | 36 |
| Tabelle 4: | Übersicht über die in der quantitativen Real-Time-PCR verwendeten murinen Primer. | 36 |
| Tabelle 5: | Antikörper und Reagenzien der Western-Blots. | 38 |
| Tabelle 6: | Antikörper und Reagenzien der Gesamt-Immunglobulin-ELISA. | 39 |
| Tabelle 7: | Antikörper und Reagenzien der OVA-spezifischen Immunglobulin- ELISA. | 39 |
| Tabelle 8: | Antikörper und Reagenzien der <i>H.p. bakeri</i> -spezifischen Immunglobulin-ELISA. | 40 |
| Tabelle 9: | Sequenzen der Genotypisierungsprimer. | 42 |
| Tabelle 10: | Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Genotypisierung. | 42 |
| Tabelle 11: | Aufbau des PCR-Programms zur Genotypisierung. | 43 |
| | | |
| Anhang Tab. I: | Übersicht über Stimulation, Aktivierungsmarker und gemessene MFI nach 24 h. | 120 |
| Anhang Tab. II: | Übersicht über Stimulation, Aktivierungsmarker und gemessene MFI nach 24 h. | 121 |
| Anhang Tab. III: | B-Zellen | 123 |
| Anhang Tab. IV: | Unreife B-Zellen | 124 |
| Anhang Tab. V: | T-Zellen | 125 |
| Anhang Tab. VI: | Myeloide Zellen | 126 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------|--|
| 1,25 D ₃ -MAARS | <i>membrane associated rapid response steroid-binding</i> , membranassoziierte und schnelle Reaktion vermittelnde Steroid- Bindung |
| 1,25(OH) ₂ D ₃ | 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Calcitriol |
| 25(OH)D ₃ | 25-Hydroxyvitamin D ₃ , Calcidiol |
| AID | <i>activation-induced deaminase</i> |
| Alum | Aluminiumhydroxid |
| ANA | anti-nukleäre Antikörper |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | Allophycocyanin |
| APC-Cy7 | Allophycocyanin-Cyanin 7 |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BCR | <i>B cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor |
| BL/6 | Mausstamm |
| bp | <i>base pair(s)</i> , Basenpaar(e) |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BTK | Bruton's-Tyrosinkinase |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calcium-Ionen |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CCS | <i>charcoal stripped fetal calf serum</i> , Aktivkohle-aufgereinigtes fötales Kälberserum |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungscluster |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA |
| Cyp27b1 | Cytochrom P450, Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1 |
| Cyp27b1 ^{+/+} | homozygote Cyp27b1-Wildtyp-Mäuse |
| Cyp27b1 ^{+/-} | heterozygote Cyp27b1-Mäuse |
| Cyp27b1 ^{-/-} | homozygote Cyp27b1-knockout-Mäuse |
| d | destilliert |
| DBP | Vitamin D-bindendes Protein |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| DNB | DNA-bindende Domäne |

| | |
|--------------------|---|
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DRFZ | Deutsches Rheuma-Forschungszentrum |
| ds | doppelsträngig |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EPG | <i>eggs per gramm faeces</i> , Eier pro Gramm Faeces |
| ES | exkretorische / sekretorische <i>H.p. bakeri</i> -Produkte |
| ES-Zellen | Embryonale Stammzellen |
| Fc | Fc-Rezeptor |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| for | <i>forward</i> , forwards |
| FSC | <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |
| GATA-3 | <i>GATA-binding protein 3</i> , GATA-bindendes Protein 3 |
| GV-SOLAS | Gesellschaft für Versuchstierkunde |
| h | <i>hour(s)</i> , Stunde(n) |
| <i>H.p. bakeri</i> | <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i> |
| HEp2 | <i>human epithelial type 2</i> , humane Epitheliomzellen Typ 2 |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| i.d. | intradermal |
| i.p. | intraperitoneal |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| LAGeSo | Landesamt für Gesundheit und Soziales |
| LBD | Ligand-bindende Domäne |
| MACS | <i>magnetic cell sorting</i> , Abtrennung von Zellpopulationen mittels Magnet |
| max. | maximal |
| MFI | <i>median fluorescence intensity</i> , Median der Fluoreszenzintensität |
| mu | murin |
| n. d. | nicht detektierbar |

| | |
|-------------------|---|
| NFAT | <i>nuclear factor of activated T cells</i> , nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen |
| NFDM | <i>non-fat dry milk</i> , fettarmes Trockenmilchpulver |
| NF- κ B | <i>nuclear factor of activated B cells</i> , nukleärer Faktor aktivierter B-Zellen |
| OVA | Ovalbumin, Hühnereiweiß |
| p | <i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit (Signifikanzwert) |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zelle des peripheren Blutes |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung |
| PBS-T | phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20 |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion |
| PDDR | <i>pseudo Vitamin D deficiency rickets</i> , Pseudo-Vitamin D-Defizienz-Rachitis |
| PE | Phycoerythrin |
| PE Vio770 | Phycoerythrin-Vio770 |
| PE-Cy5 | Phycoerythrin- Cyanin 5 |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| p NPP | para-Nitrophenylphosphat |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RANK | <i>receptor activator of nuclear factor-κB</i> |
| RANKL | <i>receptor activator of nuclear factor-κB</i> Ligand |
| RBC | <i>red blood cell</i> , Erythrozyten |
| rev | <i>reverse</i> , rückwärts |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure |
| ROR- γ t | <i>retinoic acid receptor-related orphan receptor γt</i> |
| rpm | <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| RT | Reverse Transkription |
| RXR | 9-cis-Retinsäure-Rezeptor |
| <i>S. mansoni</i> | <i>Schistosoma mansoni</i> |
| SA | Streptavidin |
| SA-HRP | Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase |

| | |
|--------------------|---|
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat |
| SDS-Page | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler |
| SLE | Systemischer Lupus erythematoses |
| SMAD | <i>mothers against decapentaplegic homologue</i> |
| SSC | <i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TGF | <i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor |
| T _H | T-Helferzelle |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> , Toll-like-Rezeptor |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRPV6 | <i>transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6</i> , Ca ²⁺ -Kanal im Darm |
| U | <i>international unit(s)</i> , internationale Einheiten |
| u. a. | unter anderem |
| VDR | Vitamin D-Rezeptor |
| VDRE | <i>vitamin D response element</i> , Vitamin D-responsives Element |
| Vit.D ₃ | Vitamin D ₃ |
| κ | kappa-Kette |

1 Zusammenfassung

Vitamin D wurde 1919 von Edward Mellanby entdeckt und erlangte schnell Bekanntheit als ein, durch die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase und des Knochenstoffwechsels, vor Rachitis schützender Faktor.

Die Entdeckung der Expression des Vitamin D-Rezeptors (VDR) und Vitamin D-aktivierender Enzyme wie die 1α -Hydroxylase CYP27B1 in zahlreichen Zelltypen des Immunsystems, deutete auf umfassendere Funktionen von Vitamin D hin.

Aktuelle Studien legen tatsächlich dar, dass ein niedriger Vitamin D-Status assoziiert mit steigenden Breitengraden, mit dem Auftreten von Autoantikörpern und damit einhergehenden Autoimmunerkrankungen wie Typ-1-Diabetes, Multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis positiv korreliert.

Für die meisten Menschen ist, neben der Zufuhr über die Nahrung, die Sonnenbestrahlung (UV-B) der Haut die Hauptquelle für die Bildung von Vitamin D. Trifft UV-B-Licht auf die Haut, entsteht aus 7-Dehydrocholesterol nach weiteren enzymatischen Prozessen in Leber und Niere, die bioaktive Form von Vitamin D, $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol). Den finalen Stoffwechselschritt katalysiert das Enzym CYP27B1, eine 1α -Hydroxylase.

Die biologische Wirkung von Calcitriol wird über dessen Bindung an seinen nukleären Rezeptor VDR vermittelt, wodurch eine Reihe makromolekularer Interaktionen herbeigeführt werden, die letztlich zur Transkription der Zielgene führen.

Um die immunmodulatorische Bedeutung von endogen produziertem Vitamin D weitergehend zu charakterisieren, wurden Cyp27b1-knockout-Mäuse, die bedingt durch eine Deletion im Exon 8 des *Cyp27b1*-Gens nicht in der Lage sind die bioaktive Form von Vitamin D zu synthetisieren, in zwei Krankheitsmodellen näher analysiert.

Die T-Zell-abhängige Sensibilisierung von Cyp27b1-knockout- und Wildtyp-Tieren mit Ovalbumin (OVA) zeigte verstärkte humorale Immunantworten mit erhöhten Konzentrationen von Gesamt- sowie spezifischen Immunglobulinen der Klassen IgG₁, IgE und IgA bei den Cyp27b1-knockout-Mäusen.

Die in einem nächsten Schritt untersuchte Leukopoese der Vitamin D-defizienten Cyp27b1-knockout-Tiere zeigte, dass die untersuchten Organe Knochenmark, Thymus, Milz und Peritoneum verminderte Gesamtzellzahlen gegenüber Wildtyp-

Tieren aufwiesen. Die Präsenz und Verteilung in den jeweiligen Zellkompartimenten offenbarte jedoch keine wesentlichen Abweichungen zwischen Cyp27b1-knockout-Mäusen und deren Wildtyp-Pendants.

Anhand eines zweiten Krankheitsmodells, welches die Infektion mit dem parasitären Helminthen *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (*H.p. bakeri*) umfasste, wurde die Bedeutung von endogen-produziertem Vitamin D näher analysiert.

Die Cyp27b1-knockout-Tiere fielen in diesem Modell durch dem Wildtyp gegenüber erhöhten totalen sowie spezifischen IgE-Werten auf. Dies war jedoch nicht mit einer verbesserten Abwehr des Parasiten verbunden. Zwischen Wildtyp- und Vitamin D-defizienten Cyp27b1-knockout-Tieren zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich parasitologischer Parameter wie der Anzahl von Nematoden im Darm und Wurmeiern in den Faeces der infizierten Tiere sowie der Fekundität der weiblichen Parasiten.

Die vorgelegten Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass endogen-produziertes Vitamin D eine Rolle für die Funktionsweise von Lymphozyten spielt. Dies äußert sich darin, dass IgE-abhängige Immunantworten bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1-knockout-Tieren verstärkt auftreten. In einem Parasiteninfektionsmodell mit *H.p. bakeri* wurden zwar erneut verstärkte IgE-Antworten beobachtet, jedoch waren keine pathophysiologischen Konsequenzen in Bezug auf die Wurmbabwehr nachweisbar. Die Ursachen dafür könnten ein zu geringer immunmodulatorischer Einfluss von Vitamin D sowie eine limitierte immunologische Bedeutung von IgE in diesem Modell sein. Durch die Anwendung eines stärker IgE-abhängigen Modells könnte eine pathophysiologische Bedeutung der Cyp27b1-Defizienz möglicherweise nachgewiesen werden.

2 Summary

Vitamin D was detected in 1919 by Edward Mellanby and became well-known as a factor in preventing rickets by maintaining calcium homeostasis and bone metabolism.

The initial discovery of the vitamin D receptor (VDR) and vitamin D-activating enzymes like CYP27B1, which are expressed in numerous cell types of the immune system, led to the assumption that the functions of vitamin D are more extensive than previously thought.

Current studies demonstrate that low vitamin D levels associated with higher latitudes correlate with the occurrence of autoantibodies and linked diseases, such as type I-diabetes, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.

Besides supplementation via food, sunlight is the main source for the formation of vitamin D. Following UV-B radiation of the skin, numerous enzymatic reactions in liver and kidneys causes 7-dehydrocholesterol to turn into the bioactive $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). The final and crucial step is thereby performed by the enzyme CYP27B1, an 1α -hydroxylase. The effect of calcitriol is mediated through binding to the VDR, resulting in the transcription of target genes.

To further investigate the immunomodulatory significance of endogenous vitamin D, we analyzed Cyp27b1-knockout mice in two disease models. These mice are unable to synthesize bioactive vitamin D due to a deletion in exon 8 of the corresponding gene.

T cell-dependent sensitization of Cyp27b1-wildtype- and Cyp27b1-knockout mice with ovalbumin (OVA) revealed an increased humoral immune response in Cyp27b1-knockout mice reflected by elevated concentrations of total and specific IgG₁, IgE and IgA.

Analysis of the leukopoiesis showed a diminished total cell count in bone marrow, thymus, spleen and peritoneum in Cyp27b1-knockout mice compared to Cyp27b1-wildtype mice. However, appearance and distribution of the analyzed cell compartments were comparable.

A second disease model using the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (*H.p. bakeri*) demonstrated enhanced secretion of total and specific IgE in Cyp27b1-knockout mice, which confirmed our previous findings. However, this showed no effect on parasite rejection, as seen in comparable results for worm

burden, eggs per gram faeces (EPG) and fecundity of female worms in Cyp27b1-wildtype- and Cyp27b1-knockout mice.

Our work verified the role of endogenous vitamin D for lymphocyte development revealed by increased IgE-dependent immune responses in Cyp27b1-knockout mice. Infection with *H.p. bakeri* confirmed enhanced IgE-responses, however, these results revealed no benefit in parasite clearance. Conceivable reasons for these observations are a minor immunomodulatory impact of vitamin D as well as a limited immunological relevance of IgE in the employed model. For further investigations, a highly IgE-dependent model could help to verify a pathophysiological significance of the Cyp27b1-deficiency.

3 Einleitung

3.1 IgE-vermittelte Typ I–Allergien

Der Begriff „Allergie“ wurde erstmals im Jahr 1906 von dem Wiener Kinderarzt Clemens Freiherr von Pirquet eingeführt und beschrieb die auf das Einbringen einer Substanz in den Organismus folgende, Antikörper-vermittelte Veränderung der spezifischen Immunreaktion. Die Veränderung dieser Substanz-spezifischen Reaktivität konnte dabei sowohl schützend als auch schädigend sein¹.

Heute wird der Begriff lediglich für die unerwünschte, verstärkte Immunreaktion auf harmlose Antigene genutzt, welche durch einen Anstieg des Immunglobulins E (IgE) gekennzeichnet ist².

IgE-vermittelte Allergien manifestieren sich je nach Zielorgan als Nahrungsmittelallergie (Darm), atopische Dermatitis (Haut), Rhinokonjunktivitis allergica (obere Atemwege) und / oder in der Lunge als Asthma bronchiale³. In den letzten beiden Jahrzehnten ist die Prävalenz dieser Erkrankungen weltweit stark angestiegen. In der deutschen Bevölkerung liegt die Sensibilisierungsrate gegenüber Allergenen wie z. B. Pollen, Milben und Tierepithelien derzeit bei 33 %⁴⁻⁶.

3.1.1 T-Zell-abhängige Sensibilisierung

Bei den meisten Allergie-auslösenden Stoffen handelt es sich um Proteine, welche sich auf Partikeln wie Pollen befinden und durch die Luft übertragen werden^{7, 8}. Dringen diese Allergene in die Schleimhaut von Augen, Nase oder Atemwegen ein, werden sie von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert. Die nun aktivierten antigenpräsentierenden Zellen wandern zum nächstgelegenen Lymphknoten und präsentieren das prozessierte, allergene Peptid naiven CD4⁺ T-Zellen, welche daraufhin zu T_H2-Zellen differenzieren⁴. Diese produzieren die Zytokine Interleukin 4 (IL-4), IL-5, IL-9 sowie IL-13 und bedingen somit eine Verstärkung der T_H2-Immunantwort ebenso wie den Isotypenklassenwechsel zu IgE bei B-Zellen^{7, 8}. Das von den B-Zellen sezernierte IgE bindet an den hochaffinen Fcε-Rezeptor I auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. Bei erneutem Allergen-Kontakt kommt es zu einer Kreuzvernetzung der IgE-Fcε-Rezeptorkomplexe auf der Zelloberfläche. Dies führt zur Ausschüttung präformierter Entzündungsmediatoren, einschließlich Histamin, und prägt das Bild der Symptome einer allergischen

Sofortreaktion⁹⁻¹¹ (Abb. 1). Andere Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren werden über einen längeren Zeitraum sezerniert und führen noch mehrere Stunden nach dem Antigenkontakt zu einer Spätreaktion^{12, 13}.

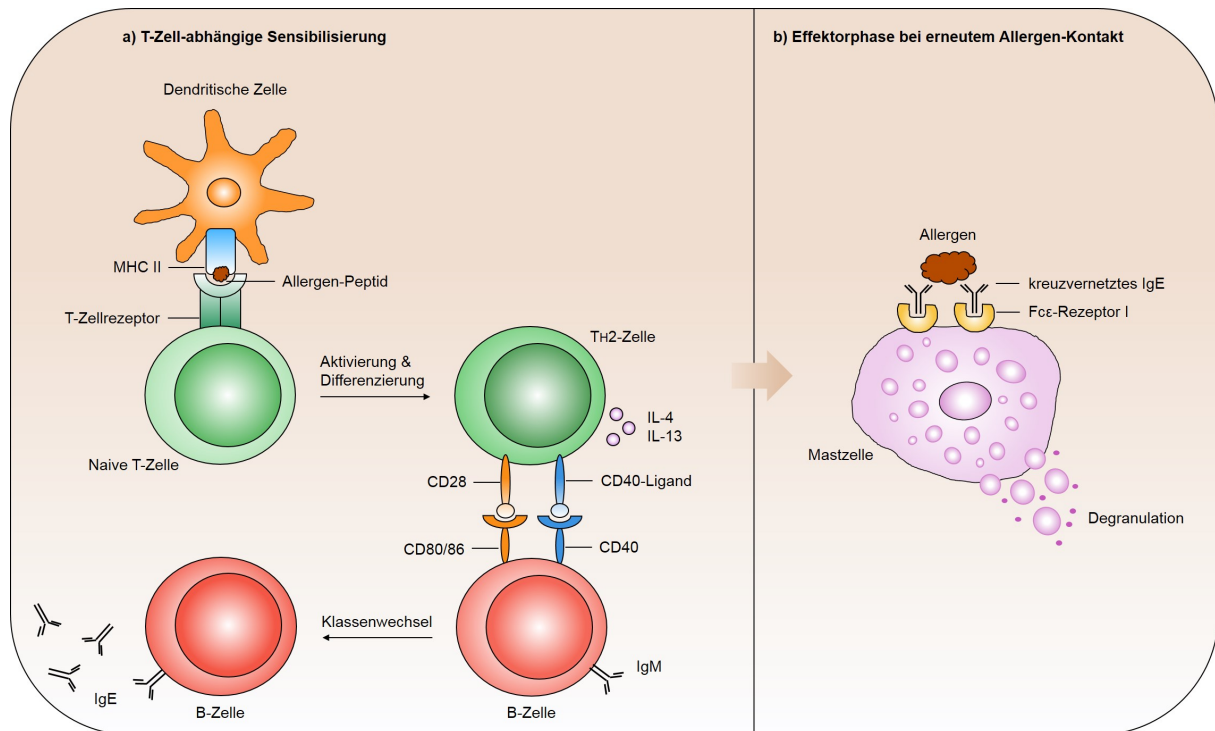


Abb. 1: Entstehung einer Typ I-Allergie¹²⁻¹⁵.

a) Bei Erstkontakt mit einem Allergen wird dieses durch eine antigenpräsentierende Zelle (z. B. dendritische Zelle) aufgenommen, prozessiert und über Bindung an ein MHC II-Molekül einer naiven T-Zelle präsentiert, wodurch diese aktiviert wird und zu einer T_H2 -Zelle differenziert. Durch die Anwesenheit von Zytokinen wie IL-4 und IL-13 sowie kostimulatorischen Molekülen wie CD40-Ligand und CD28, wird bei B-Zellen der Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE induziert^{12, 13}.

b) Das von den B-Zellen sezernierte IgE bindet an den $Fc\epsilon$ -Rezeptor I auf Mastzellen und wird dort nach einem erneuten Kontakt mit dem Allergen kreuzvernetzt, wodurch es zur Degranulation der Mastzelle und damit zur Freisetzung präformierter Entzündungsmediatoren kommt^{12, 13}.

3.1.2 Allergien – Ergebnis einer fehlgeleiteten Immunantwort, die ursprünglich dem Schutz vor Parasiten diente?

Die Tatsache, dass das Immunsystem auf scheinbar harmlose Stoffe mit einer unerwünschten, allergischen Antwort reagiert, ist bis heute nicht vollständig verstanden. Der vorherrschenden Meinung nach haben sich Immunantworten, welche durch T_H2 -Zellen vermittelt werden und zur Freisetzung von IgE führen, ursprünglich zum Schutz vor Parasiten entwickelt¹⁶.

Tatsächlich lösen sowohl Infektionen mit Parasiten als auch allergen-wirkende Stoffe eine T_H2 -Immunantwort aus, die letztendlich, durch die Freisetzung von Zytokinen und Mediatoren, zu den für diese Antwort typischen Reaktionen und Symptomen führt: Aktivierung von Makrophagen, Kontraktion der glatten Muskulatur und eine verstärkte Sekretion von Mucus^{17, 18}. T_H2 -Antworten-induzierende Stimuli wirken über verschiedene Wege wie beispielsweise die enzymatische Aktivität der auslösenden Stoffe¹⁹ oder die von ihnen verursachte Zerstörung von Gewebe^{16, 18, 20}. Die Reaktionen darauf können, wenn diese durch nicht-infektiöse Umweltantigene verursacht werden, die Symptome einer Allergie auslösen¹⁶.

Einige Beobachtungen lassen jedoch vermuten, dass sich T_H2 -Antworten ursprünglich nicht allein gegen Parasiteninfektionen, sondern auch gegen andere in der Umwelt auftretende Substanzen, wie beispielsweise Noxen entwickelt haben^{21, 22}. So ist zum Beispiel für die Abwehr einer Parasiteninfektion keine sehr schnelle Immunreaktion notwendig, wie sie im Falle einer Anaphylaxie auftritt²³. Auch scheint das bei der Immunreaktion gegen Parasiten in großen Mengen freigesetzte IgE bei der Abwehr von Helminthen unbedeutend zu sein²⁴. Unterstützt wird diese „Noxen-These“ durch Studien mit Mäusen die zeigen, dass durch eine T_H2 -Antwort induziertes IgE, welches an seinen Rezeptor (FcεRI) bindet, einen Schutz gegen Bienengift bei zuvor immunisierten Tieren vermitteln kann^{21, 25}. Dies geschieht durch von aktivierten Mastzellen freigesetzte Mediatoren wie Proteasen, die Komponenten der Gifte neutralisieren oder abbauen können²⁵. Erwünschte T_H2 -Antworten bilden sich daher möglicherweise nicht nur als Reaktion gegenüber Infektionen mit Helminthen aus, sondern können darüber hinaus auch einen Schutz bei wiederholtem Kontakt mit Noxen vermitteln. Palm et al. stellen dazu die Hypothese auf, dass jede allergische Reaktion beabsichtigt ist, selbst wenn diese bei zu starker Ausprägung nachteilig wirken kann. Denn ob ein Allergen tatsächlich harmlos ist, sei nicht sicher zu bestimmen, da ein schädigender Effekt nicht direkt offensichtlich sein muss¹⁶.

3.2 Der Nematode *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Der Nematode *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (*H.p. bakeri*) wurde erstmals 1954 von Frank A. Ehrenford unter dem Namen *Nematospiroides dubius* beschrieben²⁶. Aufgrund seiner Fähigkeit lang-andauernde Infektionen hervorzurufen, wurde

H.p. bakeri schnell ein beliebtes Labormodell um die immunologische Beziehung zwischen Wirt und Parasit zu erforschen²⁷.

3.2.1 Lebenszyklus des Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Heligmosomoides polygyrus bakeri ist ein in der wild-lebenden Mauspopulation natürlich vorkommender Parasit, der sich stark an das murine Immunsystem angepasst hat und dort chronische Infektionen hervorruft^{28, 29}.

Die Besiedlung des Wirtes beginnt mit der oralen Aufnahme infektiöser L3-Larven, die nach 24 h in das Gewebe des Duodenums eindringen und dort innerhalb von sieben Tagen zwei Häutungen vollziehen. Anschließend kehren die nun adulten Würmer in das Darmlumen zurück, wo sie sich vom Epithelgewebe des Wirtes ernähren³⁰, paaren und ca. ab Tag zehn Eier produzieren, welche über die Faeces des Wirtstieres ausgeschieden werden. Nach dem Schlüpfen der Larven häuten sich diese erneut zweimal und werden so wieder zu infektiösen L3-Larven²⁹ (Abb. 2).

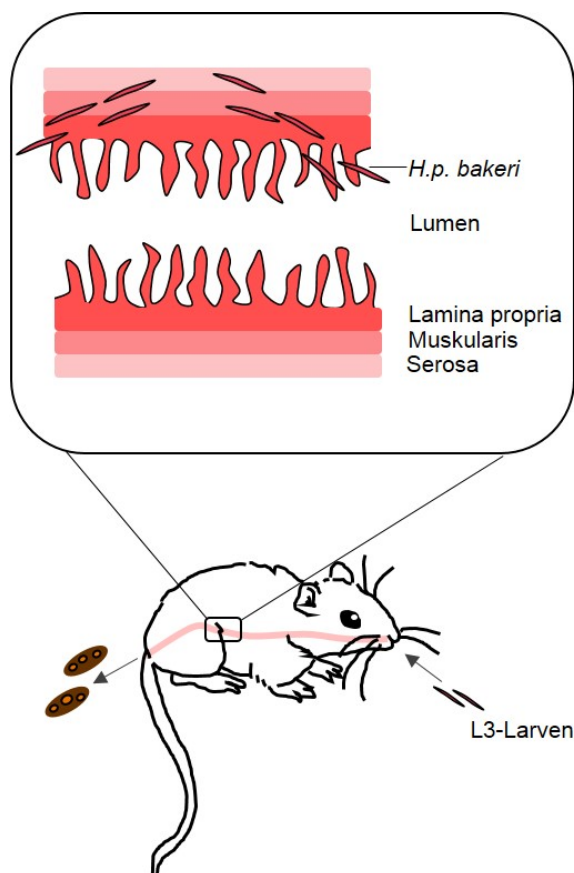


Abb. 2: Lebenszyklus des Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri*.

Nach der oralen Aufnahme infektiöser L3-Larven durch eine Wirtsmaus passieren die Nematoden den Verdauungstrakt, dringen in das Gewebe des Dünndarms ein und häuten sich dort. Etwa zehn Tage nach Aufnahme der Larven kehren die nun adulten *H.p. bakeri* zur Paarung in das Lumen des Darms zurück. Die Ausscheidung der Nematodeneier erfolgt über die Faeces des Wirtstieres.

3.2.2 Immunantwort auf die Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Die primäre Infektion der Mäuse mit *H.p. bakeri* führt zu einer T_H2-Immunantwort, die entscheidend für die Kontrolle und den Ausstoß der Parasiten ist, jedoch eine chronische Infektion mit adulten Helminthen nicht verhindern kann. Das entscheidende Zytokin bei der Immunreaktion gegen *H.p. bakeri* stellt dabei IL-4 dar³¹. Begleitet wird dies durch die Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Tregs)^{32, 33}, die eine maßgebende Rolle bei der Entstehung einer chronischen Infektion mit *H.p. bakeri* spielen³⁴. Dabei ist die erhöhte Anzahl von Tregs, die während einer Infektion mit dem Nematoden beobachtet wurde^{34, 35}, sowohl für den Parasiten als auch für den Wirt vorteilhaft. Der Parasit profitiert von der Abschwächung einer für ihn schädlichen Immunantwort, während der Wirt durch die immunsuppressive Wirkung der Tregs³⁶ vor, durch eine Abwehrreaktion verursachten, größeren Schädigungen bewahrt wird^{32, 37, 38}.

Die infizierten Tiere können durch das Verabreichen des Anthelminthikums Pyrantel pamoate von den Parasiten befreit werden. Die auf die Infizierung folgende Ausbildung einer Gedächtnis-Immunantwort ermöglicht bei einer erneuten Infektion mit dem Nematoden eine erfolgreiche Abwehr^{29, 39, 40}. Dabei sind B-Zellen von besonderer Bedeutung, da sie neben der Antigenpräsentation auch Antikörper sezernieren, kostimulatorische Signale liefern und Zytokine wie IL-2 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) produzieren³⁹. Sowohl für die Entwicklung der primären- als auch für die Gedächtnis-T_H2-Antwort bei *H.p. bakeri*-infizierten Mäusen sind B-Zellen entscheidend³⁹.

In der Anfangsphase der adaptiven Immunantwort treffen naive T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten auf antigenpräsentierende dendritische Zellen und werden so aktiviert⁴¹. Durch kostimulatorische B-Zell-Signale differenzieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen weiter zu IL-4-produzierenden T_H2-Zellen^{39, 42}. B-Zellen, die in Anwesenheit von IL-4 geprimed wurden, können große Mengen IL-2 freisetzen, das über die Verbesserung des Zugangs von Transkriptionsfaktoren zum *IL-4*-Genlocus weiter zur Differenzierung von T_H2-Zellen beiträgt³⁹. Ein weiteres Zytokin, das von IL-4-beeinflussten B-Zellen produziert wird ist TNF- α , welches durch einen bisher unbekannten Mechanismus eine andauernde Antikörper-Freisetzung fördert³⁹.

Im Gegensatz zu Infektionen mit anderen Helminthen wie z. B. *Nippostrongylus brasiliensis* spielen Antikörper bei der Abwehr von *H.p. bakeri* eine wichtige Rolle, da

sie das Wachstum der Larven und deren Migration negativ beeinflussen⁴³. Dies spiegelt sich in einer verringerten Wurmlast der infizierten Mäuse, einer verminderten Anzahl von Wurmeiern in den Faeces und einer verringerten Fekundität der weiblichen Nematoden wider⁴⁴. Dabei scheinen weder IgE noch IgA von entscheidender Bedeutung zu sein²⁴, sondern vielmehr IgG₁⁴⁵. Diese IgG₁-vermittelte Immunreaktion richtet sich hauptsächlich gegen die Larvenstadien L3 und L4 von *H.p. bakeri*⁴⁶. Der genaue Mechanismus, wie Immunglobuline die Parasitenlarven neutralisieren, ist bisher ungeklärt. Eine Möglichkeit stellt die Neutralisation der von den Larven produzierten und für Migration sowie Schutz vor der Immunabwehr benötigten Substanzen dar. Auch eine Antikörper-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems oder anderer Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen stellen Wege dar, wie Immunglobuline bei einer Infektion mit *H.p. bakeri* wirksam sein können²⁷. Tatsächlich wurden sowohl Immunglobuline als auch Makrophagen in Granulomen, welche die Larven von *H.p. bakeri* umgeben, gefunden^{24, 40}.

3.2.3 Exkretorische und sekretorische Produkte des Nematoden

Heligmosomoides polygyrus bakeri

Die Fähigkeit des Nematoden *H.p. bakeri* chronische Infektionen hervorzurufen basiert auf dessen immunmodulatorisch-wirksamen exkretorischen und sekretorischen Produkten⁴⁷ (ES), deren Wirkungen die Modulation dendritischer Zellen⁴⁸ und die Entwicklung suppressiver B-^{42, 49} sowie regulatorischer T-Zellen¹³ einschließen^{28, 29}.

Die Analyse der exkretorischen-sekretorischen Produkte von *H.p. bakeri* offenbarte, dass diese mehr als 350 verschiedene Proteine umfassen, welche unterschiedlichen Proteinfamilien zugeordnet werden können. Dazu zählen Lysozyme, Proteasen, Proteaseinhibitoren und Proteine der *venom-allergen-like*-Familie^{50, 51}.

Die immunmodulatorischen Eigenschaften von *H.p. bakeri*-Produkten können für den Wirt jedoch auch positive Effekte aufweisen. So wurde demonstriert, dass diese den Verlauf von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1^{52, 53} und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen^{35, 54, 55} positiv beeinflussen können. Die Entstehung und das Auftreten von allergischem Asthma können ebenfalls durch die exkretorischen-sekretorischen Produkte von *H.p. bakeri* im Sinne einer Verbesserung beeinträchtigt werden^{49, 56, 57}.

3.3 Vitamin D

Bereits seit der Antike ist die Knochenkrankheit Rachitis, welche primär durch einen Mangel an Vitamin D hervorgerufen wird, bekannt. Erstmals charakterisiert wurde die Rachitis zwischen 1645 und 1668 von Daniel Whistler (1645), Arnold Boot (1649), Francis Glisson (1650) und John Mayow (1668)⁵⁸. Im Jahr 1824 beschrieb der deutsche Arzt D. Schütte Lebertran als wirksames Mittel zur Behandlung der Rachitis und 1919 bestätigte Edward Mellanby in einem Experiment mit Hundewelpen, dass eine Rachitis durch die Gabe von Lebertran verhindert werden kann. Dazu postulierte er folgende Theorie: *“Rickets is a deficiency disease which develops in consequence of the absence of some accessory food factor or factors. It therefore seems probable that the cause of rickets is a diminished intake of an anti-rachitic factor, which is either fat-soluble factor A, or has a similar distribution to it”*^{58, 59}. Seine endgültige Bezeichnung als Vitamin D bekam der von Mellanby vermutete *“accessory food factor”* 1922 von McCollum et al.^{58, 60, 61}.

3.3.1 Biosynthese von Vitamin D

Vitamin D tritt in zwei Formen auf, die sich lediglich in der Struktur ihrer Seitenketten unterscheiden: Vitamin D₂ und Vitamin D₃⁶². Der in dieser Arbeit verwendete Terminus Vitamin D bezieht sich auf eine Kombination beider Formen, andernfalls wird dies durch die Benennung der zutreffenden Form verdeutlicht.

Für die meisten Menschen ist neben der Zufuhr durch die Nahrung die Sonnenbestrahlung der Haut die Hauptquelle für die Versorgung mit Vitamin D^{63, 64}.

In der Haut kommt es durch die Absorption von UV-B-Strahlung mit einer Wellenlänge von 290 nm - 315 nm durch Isomerisierung und Spaltung einer Bindung innerhalb eines 7-Dehydrocholesterol-Moleküls zur Bildung von Prä-Vitamin D₃. Dieses wird anschließend temperaturabhängig durch Isomerisierung zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) umgeformt⁶⁵. Vitamin D₃ ist biologisch inaktiv und wird, an das Vitamin D-bindende Protein (DBP) gebunden⁶⁶, über den Blutkreislauf in die Leber⁶⁷ transportiert, wo es durch die enzymatische Aktivität des Cytochroms P450 2R1 (CYP2R1) zu 25-Hydroxyvitamin D₃ (Calcidiol) umgewandelt wird⁶⁸. Von dort wird es, erneut an das DBP gebunden, zu den proximalen Tubuli der Nieren^{69, 70} transportiert und dort durch die 1 α -Hydroxylase-Aktivität des Cytochroms P450 27B1 (CYP27B1) zum biologisch aktiven 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) umgeformt^{71, 72}. Der

Abbau von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ zu Calcitriolsäure geschieht in dessen Zielgewebe und wird in mehreren Schritten durch die 24-Hydroxylase-Aktivität des Cytochroms P450 24A1 (CYP24A1) katalysiert⁷³ (Abb. 3).

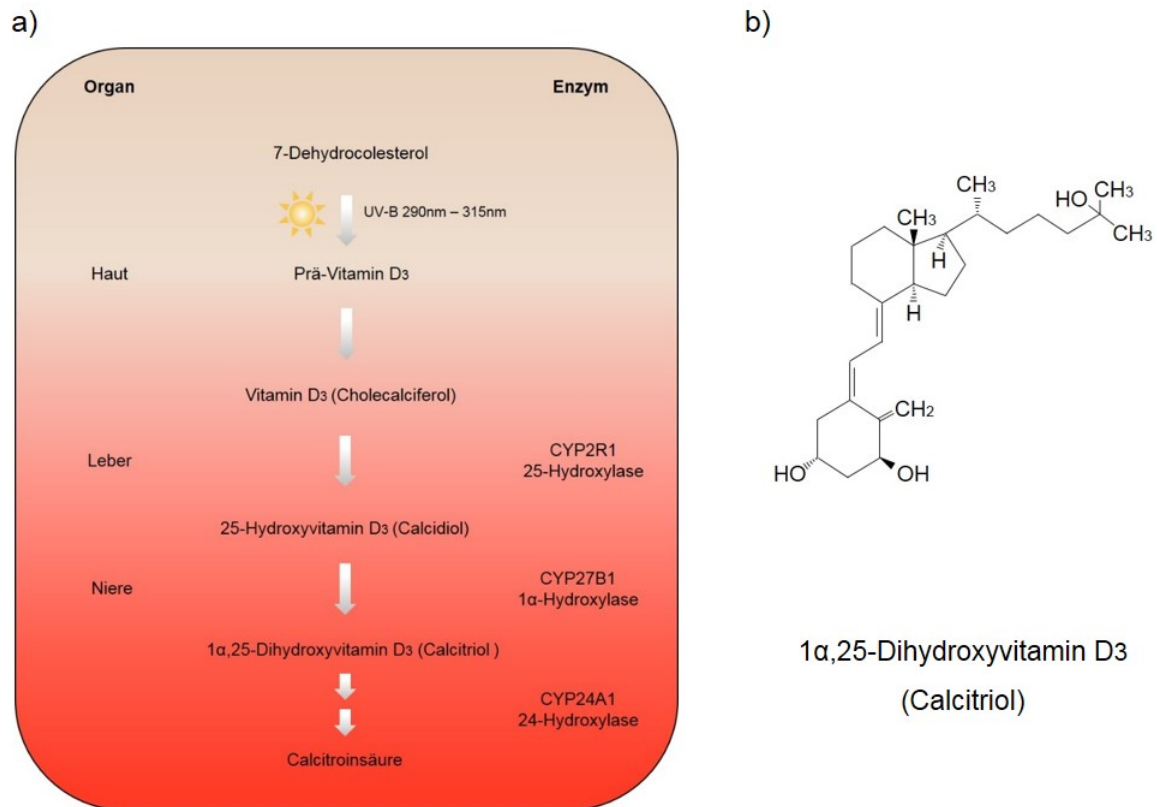


Abb. 3: Metabolismus von Calcitriol und dessen chemische Struktur.

a) Das in der Haut vorkommende 7-Dehydrocholesterol wird durch UV-B-Strahlung zu Prä-Vitamin D₃ und anschließend zu Vitamin D₃ umgewandelt. In der Leber wird das biologisch inaktive Vitamin D₃ enzymatisch zu 25-Hydroxyvitamin D₃ umgesetzt und in die Nieren transportiert, wo es durch das Enzym CYP27B1 zum biologisch aktiven $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (b) umgeformt wird. Der Abbau von Calcitriol geschieht im Zielgewebe durch das Enzym CYP24A1.

3.3.2 Der Vitamin D-Rezeptor

Der biologisch aktive Vitamin D₃-Metabolit Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) vermittelt seine Wirkung durch Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR)⁷⁴.

Der VDR ist ein Ligand-aktiver Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren^{75, 76}. Das VDR-Protein hat eine relative Molekülmasse von 48 kDa, setzt sich aus 427 Aminosäuren zusammen und kann in zwei funktionell-unterschiedliche Regionen unterteilt werden: eine C-terminale Ligand-bindende

Domäne (LBD) und eine hochkonservierte⁶⁴ N-terminale DNA-bindende Domäne (DBD)^{74, 77, 78}.

Die Ligand-bindende Domäne weist eine hydrophobe Bindungstasche für den Liganden Calcitriol auf und vermittelt die Heterodimerisierung mit dem Rezeptor für 9-cis-Retinsäure (RXR)^{79, 80}. Ebenso wird die Interaktion mit den für die Modulation der Genexpression der 1 α ,25-Dihydroxivitamin D₃-Zielgene notwendigen koregulatorischen Proteinkomplexen von der LBD ermöglicht^{79, 81}.

Die DNA-bindende Domäne beinhaltet zwei Zinkfinger-Motive und vermittelt die Interaktion mit spezifischen DNA-Sequenzen in der Promotorregion von 1,25(OH)₂D₃-Zielgenen^{64, 82}. Des Weiteren beinhaltet die DBD eine Kernlokalisierungssequenz, die mithilfe von Importinen den Transport des VDR/RXR-Komplexes entlang von Mikrotubuli in den Nukleus vermittelt^{78, 83, 84}.

In Abwesenheit des Liganden Calcitriol liegt ein großer Teil der Vitamin D-Rezeptoren im Zytoplasma vor⁸⁵. Durch die hochaffine Bindung von Calcitriol findet eine Umwandlung der Konformation des Rezeptors statt, welche die Bildung eines Heterodimers mit dem RXR begünstigt und in der Translokation des VDR/RXR-Komplexes in den Nukleus mündet^{86, 87}. Dieser bindet an *vitamin D-response elements* (VDREs) in der Promotorregion der Zielgene und steuert dort deren Expression. Dies geschieht durch die Mobilisierung verschiedener koregulatorischer Proteine, die sowohl aktivierend als auch repressiv wirken können (Abb. 4)^{74, 81, 82}.

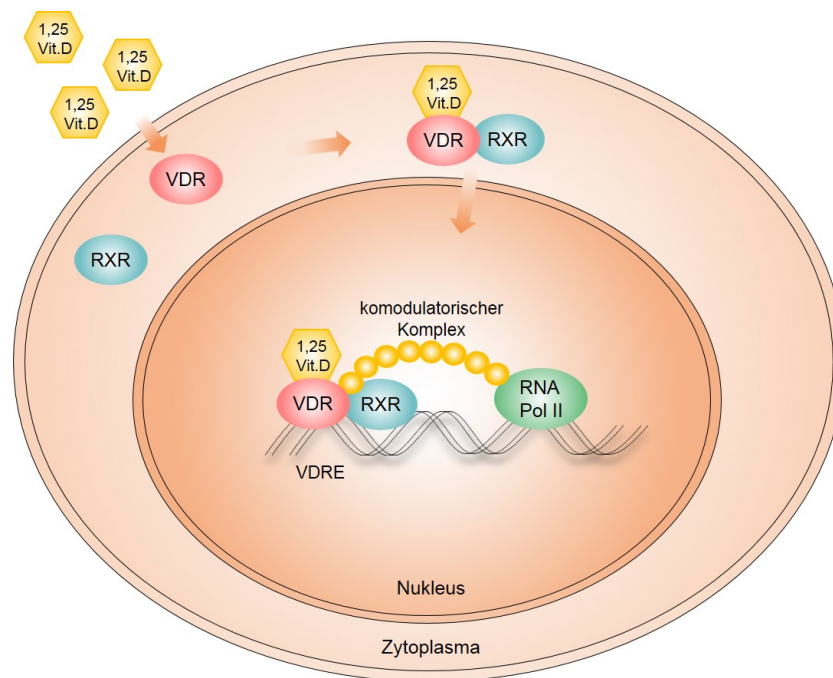


Abb. 4: Molekularer Mechanismus der genomischen Wirkung des nukleären Vitamin D-Rezeptors.

Die Bindung des Liganden $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 an den im Zytoplasma vorliegenden VDR führt zur Bildung eines Heterodimers mit dem RXR. Der VDR/RXR-Komplex transloziert in den Nukleus, bindet dort an VDREs in der Promotorregion der Zielgene und moduliert durch die Aktivierung koregulatorischer Proteinkomplexe die Genexpression.

1,25 Vit. D, $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 , $1,25(OH)_2D_3$, Calcitriol; RNA Pol III, RNA-Polymerase III; RXR, 9-cis-Retinsäure-Rezeptor; VDR, Vitamin D-Rezeptor; VDRE, *vitamin D-response element*.

Neben der genomischen Wirkung des nukleären VDR, die mehrere Stunden bis Tage benötigt und durch Inhibitoren gestört werden kann, finden schnelle VDR-vermittelte Effekte statt, die nach etwa 1-45 min eintreten^{79, 88}. Die letztgenannten werden durch eine membranständige Form des VDR⁸⁹ und / oder das $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 -bindende, membranständige Protein $1,25 D_3$ -Membrane Associated Rapid Response Steroid-binding (MAARS)^{90, 91} vermittelt. Sie umfassen den Transmembrantransport von Ionen wie z. B. Calcium- und Chlorid-Ionen sowie die Aktivierung intrazellulärer sekundärer Messenger wie cAMP^{72, 92, 93}. Der VDR wird von nahezu allen zellkernhaltigen Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert. Zu den Zellen, die nur eine sehr geringe oder keine Expression des VDR aufweisen, gehören quergestreifte Muskelfasern, Erythrozyten und einige hochdifferenzierte Zellen des Gehirns wie z. B. die Purkinjezellen des Kleinhirns^{92, 94}.

Zusammenfassend reguliert $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ über genomische und nicht-genomische Wirkungen eine Vielzahl von Genen und ist Bestandteil zahlreicher zellulärer Funktionen wie DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung und Apoptose⁹².

3.3.3 Wirkungsweise von Vitamin D

3.3.3.1 Klassische Wirkung von Vitamin D

Die klassische Wirkung von Vitamin D besteht in der Regulation der Calcium-Homöostase und des Knochenstoffwechsels⁹⁵⁻⁹⁷. Da Calcium ein Hauptbestandteil des Knochens ist und dieser wiederum den größten Calciumspeicher darstellt, sind die Calcium-Homöostase und der Knochenstoffwechsel eng miteinander verknüpft⁹⁸. Ein geringer Ca^{2+} -Serumspiegel veranlasst die Nebenschilddrüsen zur Ausschüttung von Parathormon. Dies führt zur Stimulation der Synthese von Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) durch CYP27B1 in den Nieren⁹⁹. Der daraufhin durch die Bindung des Liganden entstehende VDR/RXR-Komplex vermittelt die Expression des Ca^{2+} -Kanals TRPV6 im Darm und die damit verbundene aktive Aufnahme von Calcium wird ermöglicht⁶⁴. Des Weiteren steigert Calcitriol die Rückresorption von Ca^{2+} in den Nieren¹⁰⁰. Sollten diese Mechanismen nicht ausreichen, um den Ca^{2+} -Serumspiegel zu erhöhen, wird zusätzlich Ca^{2+} aus den Knochen mobilisiert⁹⁸. Dazu führen Parathormon und Calcitriol bei Osteoblasten zur Expression des *receptor activator of nuclear factor- κ B*-Liganden (RANKL), dessen Rezeptor RANK sich auf Osteoklasten-Vorläuferzellen befindet. Durch Bindung von RANKL an den Rezeptor RANK wird die Differenzierung und Reifung der Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten induziert. Osteoklasten wiederum sind für die Mobilisierung von Ca^{2+} aus dem Knochen verantwortlich und können so die Ca^{2+} -Konzentration im Blut konstant halten^{64, 100, 101}.

3.3.3.2 Immunmodulatorische Wirkung von Vitamin D

Neben der länger bekannten klassischen Rolle von Vitamin D bei der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase und des Knochenstoffwechsels, ließ die Entdeckung des VDR und Vitamin D-aktivierender Enzyme wie CYP27B1 in fast allen Zellen des Immunsystems weiterreichende Funktionen des Vitamins vermuten⁹⁹.

Vitamin D kann über verschiedene Wege die Funktion einer Immunzelle beeinflussen. So kann es über die aktive Form $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ direkt endokrin auf die Zielzelle wirken. Des Weiteren kann die Vorstufe $25(\text{OH})\text{D}_3$ von einer Zelle mittels CYP27B1 zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umgewandelt werden und so intrakrin bzw. autokrin agieren. Eine weitere Möglichkeit ist die parakrine Wirkung, bei der die Vorstufe $25(\text{OH})\text{D}_3$ z. B. durch dendritische Zellen zum bioaktiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umgewandelt wird und dieses anschließend T-Zellen beeinflusst. Schließlich können die Effekte von Vitamin D auch indirekt durch antigenpräsentierende Zellen vermittelt werden, die zuvor durch die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ geprägt wurden^{102, 103}.

3.3.3.2.1 Angeborenes Immunsystem

Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimieren das Enzym CYP27B1, das die Umwandlung von Calcidiol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) zum bioaktiven Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) katalysiert^{104, 105}.

Bei dendritischen Zellen führt Calcitriol zu einer Hemmung der Reifung und Differenzierung. Außerdem verringert es, durch das Herabsetzen der Expression des MHC II-Komplexes sowie der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, deren immunstimulatorische Wirkung¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Auch die Synthese von IL-12 wird durch Calcitriol bei dendritischen Zellen herabgesetzt¹⁰⁸, ebenso die Expression des *Toll-like receptor 2* (TLR2) und des TLR4 in Monozyten¹⁰⁹. Dies dient, genau wie die Hemmung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 α , IL-6 und TNF- α bei Monozyten, der Kontrolle bzw. Verhinderung überschießender Immunreaktionen^{110, 111}.

Neben den in erster Linie inhibitorischen Effekten von Vitamin D₃ auf die Zellen des angeborenen Immunsystems, treten parallel stimulatorische Wirkungen auf. So fördert es *in vitro* die Proliferation humaner Monozyten¹¹² und führt bei dendritischen Zellen zu einer erhöhten Produktion von IL-10¹⁰⁸.

Über die Bindung des VDR/RXR-Komplexes an *vitamin D-response elements* in der Promotorregion der Gene für die antimikrobiellen Peptide Cathelicidin und β -Defensin induziert Calcitriol deren Synthese in humanen Monozyten sowie Makrophagen und schützt so vor Infektionen^{101, 113, 114}. Dies wurde auch im Zusammenhang mit Verletzungen der Haut gezeigt. Hier führt bei Keratinozyten die durch den *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β_1)-vermittelte Induktion von

CYP27B1 zur Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wodurch es zur Bildung von Cathelicidin kommt¹¹⁵⁻¹¹⁷.

3.3.3.2.2 Adaptives Immunsystem

Die Effekte von Vitamin D_3 auf das adaptive Immunsystem sind überwiegend inhibitorisch. Innerhalb des T-Zell-Kompartiments sind diese am stärksten in den Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen ausgeprägt, da diese im Vergleich zu naiven Zellen eine höhere Expressionsrate des VDR aufweisen^{118, 119}.

So haben Studien gezeigt, dass die Proliferation von T-Zellen durch die Wirkung von Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) über eine Verringerung der IL-2-Produktion inhibiert wird^{120, 121}, ebenso die durch $\text{CD}8^+$ T-Zellen vermittelte Zytotoxizität¹²².

Weitere Ansätze zeigen, dass mit Calcitriol behandelte T-Zellen eine verringerte Expression von $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokinen aufweisen, während $\text{T}_\text{H}2$ -Immunantworten gefördert werden. Dies geschieht durch Hemmung der Interferon-gamma ($\text{IFN-}\gamma$)- bzw. Förderung der IL-4-Produktion^{116, 117, 123}.

Des Weiteren fördert Calcitriol die Differenzierung $\text{Foxp}3^+$ regulatorischer T-Zellen^{124, 125} und IL-10-produzierender Typ 1-regulatorischer T-Zellen^{116, 117} was besonders in Bezug auf Autoimmunkrankheiten, Transplantationen und Allergien bedeutsam ist^{113, 126}.

Bei B-Zellen wird durch die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Proliferation und Plasmazell-Differenzierung¹²⁷, ebenso wie die Immunglobulinproduktion, besonders von IgG¹¹⁷ und IgE^{128, 129}, gehemmt. Für IgE wurde gezeigt, dass dies durch die vom VDR/RXR-Komplex vermittelte Unterdrückung des ϵ -Keimbahntranskripts geschieht¹³⁰, welches die Voraussetzung für den Klassenwechsel zu IgE darstellt^{7, 131}. Ein weiterer für den Klassenwechsel unerlässlicher Faktor ist die Expression des Enzyms AID, welche ebenfalls durch Calcitriol inhibiert wird¹²⁸.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Vitamin D_3 zahlreiche immunregulatorische Wirkungen entfaltet, die den Immunstatus von pro-inflammatorisch hin zu tolerogen modulieren können^{99, 102, 113, 117}.

3.4 Vitamin D und Allergie

Weltweit ist die Inzidenz allergischer Erkrankungen in den letzten beiden Jahrzehnten stark angestiegen. Innerhalb der deutschen Bevölkerung beläuft sich die Sensibilisierungsrate derzeit auf ca. 33 %⁴⁻⁶.

Dies liegt zu einem großen Teil an veränderten Umwelt- und Lifestyle-Bedingungen wie Luftverschmutzung, Ernährung und verbesserter Hygiene¹³². Jedoch könnte auch die Fehlversorgung mit Vitamin D ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Allergien sein.

Die Evolution des frühen Menschen fand in einer sonnenreichen Umwelt statt. Es wird daher angenommen, dass die erhöhte Vitamin D₃-Produktion Melanin-ärmerer, und somit hellerer Haut, der Hauptgrund für deren Depigmentierung war¹³³. Genetische Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass die Depigmentierung der Haut während der Evolution des Menschen, nach dessen Auswanderung außerhalb Äquatorial-Afrikas, mehrfach unabhängig voneinander durch unterschiedliche Mechanismen stattgefunden hat¹³⁴.

Passend zu diesen evolutionären Aspekten zeigen einige aktuelle Studien eine erhöhte Anfälligkeit für Anaphylaxie¹³⁵ und Autoimmunerkrankungen wie entzündliche Darmerkrankungen¹³⁶, Multiple Sklerose¹³⁷ und Diabetes¹³⁸ in Regionen höherer Breitengrade, die besonders im Winter eine geringere UV-B-Strahlung aufweisen und somit zu einer verminderten Vitamin D₃-Synthese beitragen¹³⁹. Zu den Risikofaktoren für einen Vitamin D-Mangel zählen heutzutage die Bedeckung der Haut, Aufenthalt in geschlossenen Räumen, mangelhafte Aufnahme von Vitamin D über die Nahrung bedingt durch Erkrankungen wie Zöliakie oder Adipositas sowie der Einsatz von Sonnenschutzmitteln¹³⁵. Ebenso werden Polymorphismen in Genen, die an dem Vitamin D-Metabolismus beteiligt sind, als Ursache für einen Vitamin D-Mangel diskutiert¹⁴⁰.

Ob ein Mangel an Vitamin D die Entwicklung von Allergien begünstigen kann oder die Supplementation mit Vitamin D vor dem Auftreten von Allergien schützt, bleibt umstritten^{135, 141-143}.

Die immunmodulatorische Wirkung von Vitamin D wird durch dessen Einfluss auf eine Vielzahl von Immunzellen wie B- und T-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen vermittelt¹¹⁷. Diese können durch die Expression von CYP27B1 den biologisch aktiven Vitamin D-Metaboliten 1,25(OH)₂D₃ selbst synthetisieren und so den Calcitriol-Spiegel lokal erhöhen^{103, 133}. Ein daraus resultierender Effekt ist

beispielsweise die Begünstigung der Differenzierung regulatorischer T-Zellen^{117, 124}, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts spielen¹⁴⁴. Weitere Studien haben gezeigt, dass durch die Bindung des Liganden Calcitriol an den VDR die Produktion des Allergie-relevanten IgE durch die Repression des ϵ -Keimbahntranskripts inhibiert wird^{128, 130}.

3.5 Knockout des *Cyp27b1*-Gens – ein Mausmodell für Vitamin D-Defizienz

Um einen Knockout des *Cyp27b1*-Gens in Mäusen zu erzielen, wurde dessen Exon 8, welches die Häm-Bindungsdomäne enthält, entfernt¹⁴⁵. Die Häm-Bindungsdomäne bindet die prosthetische Gruppe Eisen (III)-Protoporphyrin IX (Häm), welche für die Funktion des Enzyms CYP27B1 unerlässlich ist^{146, 147}.

Der Knockout des *Cyp27b1*-Gens erfolgte mit Hilfe eines Target-Vektors, in welchem das Exon 8 des *Cyp27b1*-Gens von loxP-Sequenzen flankiert wurde. Der Target-Vektor wurde mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht. In diesen fand durch homologe Rekombination eine Integration der veränderten Sequenz in das Genom statt. Nach Selektion der positiven ES-Zellklone erfolgte die Cre-Rekombinase-vermittelte Entfernung von Exon 8 und die anschließende Injektion der ES-Zelle in C57BL/6-Embryonen im Blastozystenstadium. Die homozygoten Nachkommen dieser chimären Tiere sind zunächst phänotypisch normal. Nach 3-8 Wochen zeigen sich jedoch Auffälligkeiten wie Wachstumsverzögerungen, Hypokalzämie, sekundärer Hyperparathyreoidismus und Abweichungen des Knochenaufbaus¹⁴⁵. Durch Gabe einer mit 2 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Laktose angereicherten Nahrung kann die Ausprägung dieses Phänotyps jedoch größtenteils verhindert werden¹⁴⁸. Der hohe Anteil an Laktose diente dabei der Verbesserung der passiven Calcium-Absorption im Darm¹⁴⁹.

Über die Auswirkungen dieses gezielten Knockouts des *Cyp27b1*-Gens auf die Entwicklung des Immunsystems gibt es bisher nur wenige Studien. So wurde z. B. bei der Analyse von Subpopulationen peripherer T-Zellen in *Cyp27b1*-knockout-Mäusen gezeigt, dass diese eine verringerte Anzahl CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten aufweisen¹⁵⁰. Eine Verringerung der T-Zell-Proliferation wurde auch bei Mäusen, welche einen Knockout des VDR aufweisen gezeigt. Diese konnte jedoch durch die Erhöhung der Calcium-Zufuhr durch die Nahrung korrigiert werden¹⁵¹.

Der biologisch aktive Vitamin D₃-Metabolit Calcitriol vermittelt seine Wirkung durch Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR)⁷⁴. Studien mit VDR-knockout- und Wildtyp-Mäusen zeigen keine Abweichungen bezüglich Zellzahl und Zusammensetzung von Milz, Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und peripherem Blut bei VDR-knockout-Tieren, ebenso waren bei der Myelopoese keine Auffälligkeiten zu finden^{92, 151}.

Dementsprechend ist bisher wenig über die Entwicklung des Immunsystems und dessen Funktionsweise in einem Krankheitsmodell bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1-knockout-Mäusen bekannt. Dies war daher Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

4 Ziele der Arbeit

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass ein niedriger Vitamin D-Status sowie die mit steigenden Breitengraden einhergehende, geringere UV-B-Strahlung mit der Bildung von Auto- bzw. IgE-Antikörpern und als Folge dessen, dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen wie Typ-1-Diabetes, Multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematoses, rheumatoider Arthritis sowie der Anfälligkeit für Anaphylaxie positiv korreliert.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in einem Vitamin D-defizienten Mausmodell die physiologische Bedeutung von Vitamin D für die Ausbildung der humoralen Immunantwort nach T-Zell-abhängiger Sensibilisierung zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Auswirkung der Vitamin D-Defizienz auf die Entwicklung und Reifung von Lymphozyten sowie myeloiden Zellen geklärt werden. Darüber hinaus war es Ziel, die Rolle von Vitamin D in einem Krankheitsmodell zu analysieren. Folgende Fragen wurden in der vorliegenden Dissertation bearbeitet:

Welche Auswirkungen hat eine fehlende autokrine Vitamin D-Synthese auf die Ausbildung der humoralen Immunantwort nach T-Zell-abhängiger Sensibilisierung?

Ist die autokrine Vitamin D-Synthese eine Voraussetzung für die Etablierung eines intakten Immunstatus?

Führt die fehlende autokrine Vitamin D-Synthese im Rahmen einer Parasiteninfektion zu einer biologisch bedeutsamen, veränderten Immunantwort?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden naive Vitamin D-defiziente Cyp27b1-knockout-Mäuse sowie Wildtyp-Mäuse einer T-Zell-abhängigen Sensibilisierung unterzogen, um die Bedeutung von autokrin-produziertem Vitamin D für die humorale Immunantwort zu ermitteln. Darüber hinaus wurde die Relevanz von autokrin-produziertem Vitamin D für die Leukopoese untersucht. In einem weiteren Ansatz wurden Cyp27b1-knockout-Mäuse sowie Wildtyp-Mäuse in einem Wurminfektionsmodell mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri* analysiert.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalie / Reagenz | Hersteller |
|---|----------------------------|
| 10 mM desoxyNTPs | Rapidozym GmbH |
| 10 x GenTherm Puffer | Rapidozym GmbH |
| 100 bp DNA Ladder | New England BioLabs® |
| 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Calcitriol | Sigma-Aldrich |
| 25-Hydroxyvitamin D ₃ , Calcidiol | Sigma-Aldrich |
| 2-log DNA Ladder | New England BioLabs® |
| 5 U/ μ l GenTherm Polymerase | Rapidozym GmbH |
| 50 mM , Magnesiumchlorid, MgCl ₂ | Rapidozym GmbH |
| Advanced RPMI 1640 | Gibco® Life Technologies |
| APS, Ammoniumperoxodisulfat, H ₈ N ₂ O ₈ S ₂ | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Beriglobin | CSL Behring GmbH |
| BSA, Bovines Serumalbumin, fraction V, pH 7,0 | Serva |
| Charcoal stripped FCS (CCS) | Pan-Biotech |
| Diethanolamin, C ₄ H ₁₁ NO ₂ | Sigma-Aldrich |
| Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄ | Carl ROTH® |
| ECL Plus | Lumigen |
| EDTA, Ethylendiamintetraacetat, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ | Sigma-Aldrich |
| Ethidiumbromid, C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ | Invitrogen |
| FACS Clean | BD Biosciences |
| Glycin, C ₂ H ₅ NO ₂ | Carl ROTH® |
| Imject™ Alum Adjuvant | Thermo Scientific |
| Ionomycin | Sigma-Aldrich |
| Isofluran (Forane) | Abbott |
| Kaliumchlorid, KCl | Sigma-Aldrich |
| Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ | Merck |
| LE Agarose | Biozym |

| Chemikalie / Reagenz | Hersteller |
|---|------------------------------|
| L-Glutamin | Biochrom AG |
| MACSQuant® Running Buffer | Miltenyi |
| MACSQuant® Storage Solution | Miltenyi |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | Merck |
| Methanol, CH_4O | Merck Millipore |
| Natriumcarbonat, Na_2CO_3 | Merck |
| Natriumchlorid, NaCl | Merck Millipore |
| Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3 | Merck |
| NFDM, Milchpulver blotting grade | Carl ROTH® |
| OVA, Ovalbumin, Grade V | Sigma-Aldrich |
| PBS, ohne Mg^{2+} / Ca^{2+} | Gibco® Life Technologies |
| Penicillin | Biochrom AG |
| PFA, Paraformaldehyd | Electron Microscopy Sciences |
| Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard | Thermo Scientific |
| Pierce™ Coomassie Plus Assay Reagent | Thermo Scientific |
| PMA, Phorbol-12-myristat-13-acetat | Sigma-Aldrich |
| pNPP, para-Nitrophenylphosphat | Sigma-Aldrich |
| Precision Plus Protein™ Dual Color Standards | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Primer | TIB-Molbiol |
| Proteinase K | Macherey-Nagel |
| Proteinaseinhibitor complete mini, EDTA-frei | Roche |
| Pyrantel pamoate | Sigma-Aldrich |
| rekombinates Maus Interleukin-4 | R&D Systems |
| Rotiphorese® Gel 30 | Carl ROTH® |
| RPMI 1640 Medium | Merck Millipore |
| Saccharose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ | Merck |
| Salzsäure, HCl | Carl ROTH® |
| Saponin | Sigma-Aldrich |
| Schwefelsäure, H_2SO_4 | Merck |
| SDS, Natriumdodecylsulfat, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$ | Sigma-Aldrich |

| Chemikalie / Reagenz | Hersteller |
|--|---------------|
| β -Mercaptoethanol, C_2H_6OS | Sigma-Aldrich |
| Streptavidin-HRP | R&D Systems |
| Streptomycin | Biochrom AG |
| TEMED, N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin, $C_6H_{16}N_2$ | Sigma-Aldrich |
| TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, $C_{16}H_{20}N_2$ | Sigma-Aldrich |
| TRIS, $C_4H_{11}NO_3$ | Carl ROTH® |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich |
| Wasserstoffperoxid, H_2O_2 | Merck |
| Western-Blot Entwickler, G153 | AGFA |
| Western-Blot Fixierer, G354 | AGFA |
| Zitronensäure, $C_6H_8O_7$ | Sigma-Aldrich |

5.1.2 Puffer und Lösungen

| Puffer / Lösung | Inhaltsstoffe | Hersteller |
|---------------------------------------|--|------------------------|
| 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8 | $H_2O_{dest.}$ 0,5 M TRIS | |
| 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8 | $H_2O_{dest.}$ 1,5 M TRIS | |
| 10 x Blocking Buffer (B6429-500ML) | | Sigma-Aldrich |
| 100 mM EDTA | $H_2O_{dest.}$ 100 mM EDTA | |
| 50 x TAE-Puffer | | Genaxxon bioscience |
| Agarosegel | TAE-Puffer 2 % Agarose 0,05 % (v/v) Ethidiumbromid | |

| Puffer / Lösung | Inhaltsstoffe | Hersteller |
|-----------------------------------|--|----------------------|
| FACS-Puffer | PBS 1 % (w/v) BSA | |
| MACS-Puffer | PBS 0,5 % (w/v) BSA 2 % 100 mM EDTA | |
| Natriumcarbonat-Puffer, pH 9,0 | 50 mM NaHCO ₃ 100 mM Na ₂ CO ₃ | |
| PBS / 2 mM EDTA | PBS 2 % 100 mM EDTA | |
| PBS, pH 7,4 | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ | |
| PBS-T | PBS 0,05 % Tween 20 | |
| pNPP-Puffer | 9,7 % (v/v) Diethanolamin 1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O | |
| Red blood cell (RBC)-Lysis Buffer | | eBioscience |
| RIPA Lyse-Puffer | | Thermo Scientific |
| Sammel-Gel (SDS-Page) | 5 % (v/v) Acrylamid 25 % (v/v) 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED | |

| Puffer / Lösung | Inhaltsstoffe | Hersteller |
|------------------------------|--|------------|
| TBS-Puffer pH 7,4 | 10 mM Trizma Base 154 mM NaCl | |
| TBS-T | TBS 0,05 % Tween 20 | |
| TMB-Puffer, pH 5,5 | 200 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM Zitronensäure | |
| Trenn-Gel (SDS-Page) | 12 % (v/v) Acrylamid 25 % (v/v) 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,04 % (v/v) TEMED | |
| Western-Blot Lauf-Puffer | 192 mM Glycin 24,8 mM Trizma Base 0,1 % (w/v) SDS | |
| Western-Blot Transfer-Puffer | 192 mM Glycin 24,8 mM Trizma Base 20 % (v/v) Methanol | |
| Western-Blot Lade-Puffer 5x | 250 mM TRIS, pH 6,8 10 % SDS 50 % Glycerin 0,02 % Bromphenolblau, vor Gebrauch: 10 % β-Mercaptoethanol dazu | |

5.1.3 Antikörper und Enzyme

| Antikörper / Enzym | Bezeichnung / Klon | Hersteller |
|--------------------|--------------------|------------|
| anti-CD4 PE-Cy5 | RM4-5 | Biologend |
| anti-IgE-Biotin | EM95.3 | DRFZ |

| Antikörper / Enzym | Bezeichnung / Klon | Hersteller |
|---|--------------------|------------------|
| anti-Maus B220 FITC | RA3.6B2 | DRFZ |
| anti-Maus CD137 PE Vio770 | 17B5-1H1 | Miltenyi |
| anti-Maus CD14 PE | rmC5-3 | BD |
| anti-Maus CD19 APC-Cy7 | 6D5 | Biolegend |
| anti-Maus CD19 MicroBeads | | Miltenyi |
| anti-Maus CD28 | 37.51 | DRFZ |
| anti-Maus CD3 PerCP | 145-2C11 | Biolegend |
| anti-Maus CD3e | 145-2C11 | Miltenyi |
| anti-Maus CD4 APC | GK1.5 | Miltenyi |
| anti-Maus CD40 | FGK-45 | DRFZ |
| anti-Maus CD69 PE | H1.2F3 | BD |
| anti-Maus CD8 Pacific Blue | 53-6.7 | DRFZ |
| anti-Maus CD86 Vio Blue | PO3.3 | Miltenyi |
| anti-Maus Fcγ-Rezeptor | 2.4G2 | DRFZ |
| Beriglobin | | CSL Behring GmbH |
| <i>H.p. bakeri</i> -ES-Biotin | | DRFZ |
| Kaninchen anti-Cyp27b1 | ab95047 | abcam |
| Kaninchen anti-β-Aktin (sc-130656) | N21 | Santa Cruz |
| Maus anti-OVA IgG ₁ (A6075) | OVA-14 | Sigma-Aldrich |
| Maus IgA (0106-01) | S107 | Southern Biotech |
| Maus IgE, κ (557079) | C38-2 | BD |
| Maus IgG ₁ , κ (557273) | MOPC-31C | BD |
| OVA-Biotin | | DRFZ |
| Ratte anti-Maus IgE (553413) | R35-72 | BD |
| Ratte anti-Maus IgG ₁ -Biotin (553441) | A85-1 | BD |
| Ratte anti-VDR | 9A7 | Millipore |
| Streptavidin-HRP | | R&D |
| Ziege anti-Kaninchen-HRP (sc-2004) | | Santa Cruz |
| Ziege anti-Maus IgA (1040-01) | | Southern Biotech |
| Ziege anti-Maus IgA-AP (1040-04) | | Southern Biotech |

| Antikörper / Enzym | Bezeichnung / Klon | Hersteller |
|--|---------------------------|-------------------|
| Ziege anti-Maus IgA-Biotin (1040-08) | | Southern Biotech |
| Ziege anti-Maus IgG ₁ (1070-01) | | Southern Biotech |
| Ziege anti-Maus IgG ₁ (1070-04) | | Southern Biotech |
| Ziege anti-Ratte – HRP (sc-2065) | | Santa Cruz |
| Zombie NIR™ | | Biolegend |

5.1.4 Kits

| Kit | Hersteller |
|--|-------------------------------|
| 25-Hydroxy-Vitamin D EIA | immunodiagnosticsystems (ids) |
| ANA Hep-2 plus | GA Generic Assays |
| CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, mouse | Miltenyi |
| NucleoSpin® RNA (740955.250) | Macherey-Nagel |
| NucleoSpin® Tissue (740952.250) | Macherey-Nagel |
| Rotor-Gene™ SYBR® Green PCR-Kit | Qiagen |
| TaqMan® Reverse Transcription Reagents | Applied Biosystems |

5.1.5 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|-------------------|
| 96-well Mikrotiterplatte, flat-bottom, maxi sorb | NUNC |
| 96-well Zellkulturplatte, F-bottom | Greiner Bio-One |
| Animal Lancet, 5 mm | Goldenrod |
| LS-Säulen | Miltenyi |
| Microtainer® PST™ LH Amber Tubes | BD |
| Petrischalen | Sarstedt |
| Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl | Sarstedt |
| Pre-Separation Filter | Miltenyi |
| Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml | Sarstedt |
| serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml | Falcon® |
| Western-Blot Polyvinylidenfluorid-Membran | GE Healthcare |

| Material | Hersteller |
|---|-------------------|
| Western-Blot-Film (Hyperfilm) | GE Healthcare |
| Whatman-Filterpapier (Mini Trans-Blot Filter paper) | Bio-Rad |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml | BD Biosciences |
| Zentrifugenröhrchen 50 ml | Falcon® |

5.1.6 Laborgeräte

| Laborgerät | Bezeichnung | Hersteller |
|------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| CASY®-Zellzähler | Casy 1, Modell TTC | Schärfe System |
| CO ₂ -Inkubator | Heracell 150 | Thermo Electron Corporation |
| Durchflusszytometer | MACSQuant ® | Miltenyi |
| ELISA-Reader | Dynex MRX Version 1.33 | DYNATECH |
| Geldokumentation | GeneGenius | Syngene |
| Gelelektrophorese-Laufkammer | Sub-Cell® GT | Bio-Rad |
| Heizplatte und Magnetrührer | Sb 162 | Bibby Sterilin |
| MACS-Magnete | QuadroMACS™ | Miltenyi |
| MACS-Magnetständer | MACS Stand Multi | Miltenyi |
| Mehrkanalpipette | 10 µl - 100 µl | Eppendorf |
| Multistepper | Multipette® plus | Eppendorf |
| pH-Meter | pH-Meter 761 | Calimatic |
| Pipetten | 0,5 µl - 10 µl | Eppendorf |
| Pipetten | 10 µl - 100 µl | Eppendorf |
| Pipetten | 100 µl - 1000 µl | Eppendorf |
| Pipetten | 2 µl - 20 µl | Brand |
| Pipetten | 20 µl - 200 µl | Brand |
| Pipettierhelfer | pipetus® | Hirschmann Laborgeräte |
| Plattenschüttler | KS 501 digital | IKA Labortechnik |
| Rollmischer | Roller-Mixer | Ratek |
| Sicherheitswerkbank | HERAsafe | Heraeus |

| Laborgerät | Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Spektralphotometer | NanoDrop 1000 | Thermo Scientific |
| Stromversorgung | PowerPac™ HV | Bio-Rad |
| Stromversorgung | PowerPac 300 | Bio-Rad |
| Thermocycler | Px2 Thermal Cycler | Thermo Scientific |
| Thermomixer | comfort 1,5 ml | Eppendorf |
| Thermomixer | ThermoStat plus 2 ml | Eppendorf |
| Überkopf-Mischer | Intelli-Mixer | Neolab |
| Vortexmischer | REAX 2000 | Heidolph |
| Waage | 50 mg - 120 g | Sartorius |
| Waage | 5 g - 4,84 kg | Sartorius |
| Western-Blot- Elektrophoresekammer | Mini-PROTEAN® Tetra System | Bio-Rad |
| Western-Blot-Glasplatten | 1,5mm Spacer | Bio-Rad |
| Western-Blot-Glasplatten | Cover Plates | Bio-Rad |
| Western-Blot-Kämme | 10 / 15 well, 1,5 mm | Bio-Rad |
| Western-Blot-Kassette | Hypercassette | GE Healthcare |
| Western-Blot- Transferkammer | Mini Trans Blot | Bio-Rad |
| Zentrifuge | centrifuge 5417 R | Eppendorf |
| Zentrifuge | centrifuge 5427 R | Eppendorf |
| Zentrifuge | Megafuge 1.0R | Heraeus |
| Zentrifuge | Multifuge 4 KR | Heraeus |
| Zentrifuge | Sprout Minizentrifuge | Biozym |
| Fluoreszenzmikroskop | Axioplan 2 | Zeiss |
| Mikroskop | CKX 41 | Olympus |
| Western-Blot Dokumentationsanlage | Fusion FX7 | Vilber Lourmat |

5.1.7 Software

| Software | Hersteller |
|------------------------|-------------------|
| FlowJo V10 | Tree Star, Inc. |
| GeneSnap | Syngene |
| GraphPad Prism 5 und 6 | GraphPad Software |
| Revelation G3.2 | Dynex |
| Rotor-Gene Q | Qiagen |

5.2 Methoden

5.2.1 Zellbiologische Methoden

5.2.1.1 Aufreinigung muriner Splenozyten

Zur Gewinnung muriner Splenozyten wurden BL/6-Mäusen die Milzen entnommen und in sterilem PBS / EDTA bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurde jede Milz einzeln in einer Petrischale in einem 100 µm-Zellsieb platziert, mit kaltem PBS / EDTA inkubiert und mit einem 5 ml-Spritzenstempel zerdrückt, bis nur noch die Milzkapsel sichtbar war. Spritzenstempel und Sieb wurden gründlich mit PBS / EDTA abgespült und größere Gewebestücke durch Resuspendieren mittels einer 1000 ml-Pipette zerkleinert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend mit einer 25 ml-Pipette über ein 40 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Der Inhalt des Röhrchens wurde mit PBS / EDTA auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 340 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet aufgeklopft, in 2,5 ml 1x RBC-Lysis Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Röhrchen mit PBS / EDTA auf 50 ml aufgefüllt und erneut 10 min bei 340 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl im CASY®-Zellzähler bestimmt.

5.2.1.2 Separation muriner B- und T-Lymphozyten

Alle folgenden Mengenangaben von MACS-Puffer und *MicroBeads* beziehen sich, wenn nicht anders beschrieben, auf 1×10^7 Zellen. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte im CASY®-Zellzähler.

Zur Auftrennung der Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS) wurde die Zellsuspension nach Bestimmung der Zellzahl 10 min bei 340 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert und 10 µl *CD19 MicroBeads* hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Kühlschrank bei 4 °C, wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und 10 min bei 340 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 800 µl MACS-Puffer resuspendiert und über einen Pre-Separation-Filter auf eine befeuchtete LS-Säule aufgetragen. Die Säule wurde 3 x

mit MACS-Puffer gespült, der CD19-negative Durchfluss aufgefangen und anschließend die CD19-positiven B-Zellen eluiert.

Die CD19-negative Zellsuspension wurde 10 min bei 340 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 40 µl MACS-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl *CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail* und Inkubation für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl *anti-Biotin MicroBeads* hinzugefügt und das Gemisch für weitere 10 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und 10 min bei 340 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 800 µl MACS-Puffer resuspendiert, über einen Pre-Separation-Filter auf eine befeuchtete LS-Säule aufgetragen und diese anschließend 3 x mit MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss mit den CD4-positiven T-Zellen wurde aufgefangen. Die Reinheit der einzelnen Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch durch Färbung von CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 und B220 überprüft und lag zumeist bei $\geq 96\%$.

5.2.1.3 Kultivierung und Stimulation muriner B- und T-Lymphozyten

Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Advanced RPMI mit 5 % *charcoal stripped fetal calf serum* (CCS), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in einem Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert. Zur Bestimmung der Gen- sowie Proteinexpression von Cyp27b1, VDR und Cyp24a1 wurden frisch isolierte sowie für den angegebenen Zeitraum unstimulierte und stimulierte CD19⁺ B-Zellen bzw. CD4⁺ T-Zellen verwendet. Die Stimulation der CD19⁺ B-Zellen erfolgte mit 10 µg/ml anti-CD40 und 20 ng/ml IL-4, die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit 3 µg/ml anti-CD3 und 1 µg/ml anti-CD28. Die Stimulationsdauer lag bei 24 h, 48 h und 120 h.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1 Ribonukleinsäure-Isolierung

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren (RNA) erfolgte mithilfe des *NucleoSpin® RNA-Kits* gemäß Herstellerangaben. Dabei wurden die Zellen zunächst mit 350 µl RA1-

Puffer lysiert und die enthaltenen Nukleinsäuren an eine Filtermembran gebunden. Der Abbau der unerwünschten DNA erfolgte durch Behandlung der Membran mit DNase. Nach mehreren Waschschritten wurde die gebundene RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration bei 260 nm im NanoDrop Spektralphotometer gemessen.

5.2.2.2 Synthese komplementärer DNA

Das Umschreiben der aus den Zellen isolierten Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte durch Verwendung der *TaqMan® Reverse Transcription* Reagenzien gemäß Herstellerangaben. Die cDNA-Synthese erfolgte dabei durch die enzymatische Aktivität der Reversen Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus*, die sowohl einsträngige RNA als aus DNA als Matrize zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges nutzen kann¹⁵².

| Zusammensetzung | Volumen pro Probe | Endkonzentration |
|---|-------------------|------------------|
| 10 x TaqMan RT-Puffer | 2 µl | 1 x |
| 25 mM MgCl ₂ | 4,4 µl | 5,5 mM |
| 10 mM desoxyNTPs | 4 µl | 2 mM |
| 50 µM Random Hexamer Primer | 0,5 µl | 1,25 µM |
| 50 µM Oligo d(T) ₁₆ Primer | 0,5 µl | 1,25 µM |
| 20 U/µl RNase Inhibitor | 0,4 µl | 0,4 U/µl |
| 50 U/µl MultiScribe Reverse Transcriptase | 0,5 µl | 1,25 U/µl |

Tabelle 1: Zusammensetzung eines Ansatzes für die cDNA-Synthese.

| Schritt | Temperatur | Dauer |
|----------------------------|------------|--------|
| Primer-RNA-Hybridisierung | 25 °C | 10 min |
| Reverse Transkription (RT) | 48 °C | 40 min |
| RT-Inaktivierung | 95 °C | 5 min |

Tabelle 2: Aufbau des PCR-Programms für die cDNA-Synthese.

5.2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein enzymatisches Verfahren, das die Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments ermöglicht. Dazu wird eine Matrizen-DNA, Primer, Nukleotide und eine DNA-Polymerase benötigt, welche ausgehend vom Primer aus den Nukleotiden einen Strang komplementär zur Matrize synthetisiert. Zur Bestimmung der Menge eines bestimmten Gens in einer Probe wurde die quantitative Echtzeit-PCR (*Real-Time-PCR*) genutzt, die den Nachweis und die Quantifizierung des PCR-Produktes während der Synthese in Echtzeit ermöglicht¹⁵³. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu der *Rotor-Gene Q* und das *Rotor-Gene™ SYBR® Green PCR-Kit* gemäß Herstellerangaben verwendet. SYBR Green ist ein Cyaninfarbstoff, welcher spezifisch mit doppelsträngiger (ds) DNA interkaliert und dessen Fluoreszenz in der DNA-gebundenen Form 1000-fach höher als in der freien Form ist. Der Farbstoff wird durch blaues Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und emittiert grünes Licht bei 520 nm¹⁵⁴. Während der DNA-Synthese nimmt die Menge an dsDNA und damit die Fluoreszenz von SYBR Green zu, was zur Quantifizierung des Zielgens in einer Kurve aufgezeichnet wird. Die Spezifität des PCR-Produktes wird durch eine Schmelzkurve gezeigt, bei der durch kontinuierliches Erhitzen der DNA-Doppelstrang, bei einer für das PCR-Produkt spezifischen Schmelztemperatur, aufgetrennt und das SYBR Green freigesetzt wird, wodurch die Fluoreszenz messbar abnimmt.

Alle hier angegebenen Primer wurden, sofern nicht bereits vorhanden, mit der Software Primer3¹⁵⁵ erstellt und über die Firma TIB Molbiol Berlin bezogen. Die Effizienz der Primer sowie deren optimale Hybridisierungstemperatur und die Elongationszeit wurden ermittelt und alle darauffolgenden Messungen als Doppelbestimmungen mit Wasser als Negativ-Kontrolle durchgeführt.

Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurden die gemessenen Werte des Zielgens über die Expression des Referenzgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normalisiert¹⁵⁶ und nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet¹⁵⁷.

| Zusammensetzung | Volumen pro Probe | Endkonzentration |
|---|------------------------|------------------------|
| 2 x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix | 5 µl | 1 x |
| 10 µM Primer for | 0,2 µl / 0,5 µl / 1 µl | 200 nM / 500 nM / 1 µM |
| 10 µM Primer rev | 0,2 µl / 0,5 µl / 1 µl | 200 nM / 500 nM / 1 µM |
| cDNA | 2 µl | |
| dH ₂ O | auf 10 µl auffüllen | |

Tabelle 3: Zusammensetzung eines Ansatzes für die quantitative Real-Time-PCR.

| Primer | Sequenz | Hybridisierung | Primer-Effizienz |
|--|---|----------------|------------------|
| <i>Hprt</i> for <i>Hprt</i> rev | 5'-cgtcgtgattagcgatgatg-3' 5'-aatccagcaggtcagcaaag-3' | 60 °C | 1,91 |
| <i>Cyp27b1</i> for <i>Cyp27b1</i> rev | 5'-ccgcgggctatgctggaac-3' 5'-ctctgggcaaaggcaaactctga-3' | 64 °C | 1,8 |
| <i>Vdr</i> for <i>Vdr</i> rev | 5'-accctggtgactttgaccg-3' 5'-ggcaatctccattgaagggg-3' | 60 °C | 1,96 |
| <i>Cyp24a1</i> for <i>Cyp24a1</i> rev | 5'-gaagatgtgaggaatatgccctattt-3' 5'-ccgagttgtgaatggcacact-3' | 62 °C | 1,94 |

Tabelle 4: Übersicht über die in der quantitativen Real-Time-PCR verwendeten murinen Primer.

5.2.2.4 Herstellen von Zelllysaten

Für die Gewinnung von Zelllysaten wurden pro Ansatz 2×10^7 Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit PBS gewaschen und 10 min bei 2400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl Lysepuffer mit Proteinase-Inhibitor zum Zellpellet gegeben. Das Gemisch wurde anschließend 2 h bei 4 °C unter ständiger Durchmischung inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.2.5 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels Bradford-Test. Dieser beruht auf der Interaktion basischer Aminosäure-Reste wie beispielsweise Arginin, Lysin und

Histidin mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 in saurer Lösung. Dabei führt die Bindung des Farbstoffs an die Proteine zu einer Verschiebung seines Absorptionsspektrums von 465 nm zu 595 nm¹⁵⁸, was photometrisch gemessen werden kann. Durch die Verwendung einer Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) bekannter Konzentration, wird die Berechnung der in der Probe enthaltenen Proteinkonzentration ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden dazu je 150 µl Proteinstandard oder verdünnte Probe in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben, 150 µl Coomassie-Brilliant-Blau hinzugefügt und der Farbumschlag photometrisch bei 595 nm gemessen. Anhand der Eichgeraden wurde anschließend die in der jeweiligen Probe enthaltene Proteinmenge berechnet.

5.2.3 Immunologische Methoden

5.2.3.1 Western-Blot

Die Methode des Western-Blots ermöglicht einen spezifischen Nachweis von Proteinen. Dabei werden die in der Probe enthaltenen Proteine zunächst durch ein geeignetes Detergenz denaturiert und mit einer negativen Ladung versehen. Dies ermöglicht die Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Größe mittels Gelelektrophorese. Anschließend erfolgt der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Blotting), auf welcher der spezifische Nachweis des Zielproteins erfolgt. Dabei bindet ein gegen das Zielprotein gerichteter primärer Antikörper an sein Epitop, welcher wiederum durch einen Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper erkannt wird. Die durch Zugabe eines geeigneten Substrats auftretende Chemilumineszenzreaktion zeigt das Vorhandensein des Zielproteins und kann durch das Auflegen eines lichtempfindlichen Films sichtbar gemacht werden¹⁵⁹.

5.2.3.1.1 Western-Blot von CYP27B1, VDR und β -Aktin

Die Methode des Western-Blots wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Proteine CYP27B1, VDR und β -Aktin bei frisch isolierten, unstimulierten und stimulierten T- und B-Lymphozyten murinen Ursprungs verwendet. Dazu wurde die gewünschte Menge der Proteinlösung zunächst auf Eis aufgetaut, mit Lade-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in

einem SDS-Polyacrylamid-Gel (12 %) für 10 min bei 60 V und später für ca. 90 min bei 110 V. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und diese zum Vermeiden unspezifischer Bindungen 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % *non-fat dry milk* / PBS (NFDM / PBS) geblockt. Die Inkubation mit dem gegen das Zielprotein gerichteten primären Antikörper erfolgte in 1 % NFDM / PBS-T bzw. 1 % NFDM / TBS-T über Nacht bei 4 °C. Nachdem die Membran 4 x mit PBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper in 1 % NFDM / PBS-T bzw. 1 % NFDM / TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Membran fand die Chemilumineszenzreaktion mittels Zugabe von Lumigen® ECL Plus statt, die durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films sichtbar gemacht wurde.

| Western-Blot | primärer Antikörper | Blocken | Waschen | sekundärer Antikörper |
|--------------|------------------------|------------------|---------|------------------------------|
| CYP27B1 | Kaninchen anti-CYP27B1 | 5 % NFDM/ PBS | PBS-T | Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP |
| VDR | Ratte anti-VDR | 5 % NFDM/ PBS | PBS-T | Ziege anti-Ratte IgG-HRP |
| β-Aktin | Kaninchen anti-β-Aktin | 5 % NFDM/ PBS | PBS-T | Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP |

Tabelle 5: Antikörper und Reagenzien der Western-Blots.

5.2.3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein analytisches Verfahren zur Detektion und Quantifizierung spezifischer Antigene oder Antikörper in einer flüssigen Probe. Dabei führt die Bindung verschiedener Antigene und Antikörper letztendlich zu einem enzymatisch-vermittelten Farbumschlag, der das Vorhandensein der nachzuweisenden Substanz in der Probe anzeigt ¹⁶⁰.

5.2.3.2.1 Immunglobulin-ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zum Nachweis spezifischer Immunglobuline im Blutplasma sensibilisierter bzw. infizierter Mäuse eingesetzt. Dazu wurde die Oberfläche einer 96-well Mikrotiterplatte mit einem Antigen bzw.

Antikörper, gelöst in Natriumcarbonat-Puffer, über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach dem Waschen mit PBS-T wurde die Platte zur Vermeidung unspezifischer Bindungen bei Raumtemperatur geblockt, anschließend das Blutplasma in geeigneten Verdünnungen zusammen mit 13 Standards unterschiedlicher Konzentration aufgetragen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T erfolgte für 1 h die Inkubation mit dem Detektions-Antikörper.

Die nachfolgende Zugabe der Enzyme Meerrettichperoxidase (HRP) bzw. Alkalische Phosphatase (AP) und des entsprechenden chromogenen Substrats führte zu einem Farbumschlag, der photometrisch gemessen wurde. Anhand einer Standardkurve erfolgte die Berechnung der im Plasma enthaltenen Immunglobulin-Konzentrationen.

| ELISA | Beschichtung | Blocken | Standard | Detektion | Enzym / Substrat |
|------------------|-----------------------|----------------|----------------------|-----------------|------------------|
| IgG ₁ | anti-IgG ₁ | 3 % BSA / PBS | IgG ₁ , κ | anti-IgG-AP | pNPP |
| IgE | anti-IgE | 3 % NFDM / PBS | IgE, κ | anti-IgE-Biotin | SA-HRP / TMB |
| IgA | anti-IgA | 3 % BSA / PBS | IgA, κ | anti-IgA-AP | pNPP |

Tabelle 6: Antikörper und Reagenzien der Gesamt-Immunglobulin-ELISA.

| ELISA | Beschichtung | Blocken | Standard | Detektion | Enzym / Substrat |
|----------------------|--------------|----------------|---------------------------|-------------------------------|------------------|
| OVA-IgG ₁ | OVA | 3 % NFDM / PBS | anti OVA-IgG ₁ | anti-IgG ₁ -Biotin | SA-HRP / TMB |
| OVA-IgE | anti-IgE | 3 % BSA / PBS | Plasmapool | OVA-Biotin | SA-HRP / TMB |
| OVA-IgA | OVA | 3 % NFDM / PBS | Plasmapool | anti-IgA-Biotin | SA-HRP / TMB |

Tabelle 7: Antikörper und Reagenzien der OVA-spezifischen Immunglobulin-ELISA.

| ELISA | Beschichtung | Blocken | Standard | Detektion | Enzym / Substrat |
|-------------------------------|-----------------------|--|------------|------------------------|------------------|
| <i>H.p.</i> -IgG ₁ | anti-IgG ₁ | 1x Blocking Buffer/ 5 % Saccharose / PBS | Plasmapool | <i>H.p.</i> -ES-Biotin | SA-HRP / TMB |
| <i>H.p.</i> -IgE | anti-IgE | 3 % NFDM / PBS | Plasmapool | <i>H.p.</i> -ES-Biotin | SA-HRP / TMB |
| <i>H.p.</i> -IgA | anti-IgA | 1x Blocking Buffer/ 5 % Saccharose / PBS | Plasmapool | <i>H.p.</i> -ES-Biotin | SA-HRP / TMB |

Tabelle 8: Antikörper und Reagenzien der *H.p. bakeri*-spezifischen Immunglobulin-ELISA.

5.2.3.2.2 25-Hydroxyvitamin D₃-ELISA

Die Messung der 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentration (25(OH)D₃) im Blutplasma der Mäuse erfolgte mithilfe des 25-Hydroxy-Vitamin D-Enzymimmunoassays der Firma Immunodiagnostic Systems (IDS) und wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

5.2.3.3 HEp2-Test zum Nachweis autoreaktiver Antikörper

Der Nachweis von autoreaktiven Antikörpern gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene in Blutplasma von Mäusen wurde mithilfe des ANA Hep-2 plus Immunfluoreszenztests der Firma Generic Assays® gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Auf Objektträgern fixierte HEp-2-Zellen wurden dazu mit verdünnten Plasmaproben der zu testenden Mäuse inkubiert. Waren autoreaktive Antikörper im Blutplasma vorhanden, reagierten diese spezifisch mit den Antigenen der HEp-2-Zellen, was durch Zugabe FITC-konjugierter anti-muriner Antikörper (α -IgG₁, -IgG_{2a}, -IgG_{2b}, -IgG_{2c}, -IgA) mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert wurde. Dabei gaben die Fluoreszenzmuster Aufschluss über die Lokalisation der Antigene der autoreaktiven Antikörper. Nach Herstellerangaben liegt ein positives Ergebnis vor, wenn ab einer Verdünnungsstufe des Blutplasmas von 1:80 eine Fluoreszenz detektierbar ist.

5.2.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, das es erlaubt, einzelne Zellen einer Zellsuspension hinsichtlich spezifischer Eigenschaften zu analysieren.

Die ersten optischen Informationen liefern dabei das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FCS) und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), die anhand des Winkels, in dem die Zelle Licht emittiert, Aussagen über ihre Größe und Granularität erlauben. Zusätzlich dazu können Zellen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper, die gegen spezifische intra- und extrazelluläre Epitope gerichtet sind, markiert werden. Die Fluorochrom-markierten Zellen werden anschließend einzeln an einem Laser vorbeigeführt und die gebundenen Fluorochrome mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, die nun ihrerseits Licht emittieren. Durch ein optisches System werden diese Signale aufgefangen und analysiert¹⁶¹.

5.2.3.4.1 Durchflusszytometrische Analyse der Leukopoese von Cyp27b1^{-/-}-Mäusen

Um zu untersuchen, ob Mäuse mit einem Knockout des *Cyp27b1*-Gens eine vom Wildtyp abweichende Leukopoese aufweisen, wurden jeweils drei 7-Monate alte Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Tiere durch Jana Winckler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fritz Melchers vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie durchflusszytometrisch untersucht.

5.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten

5.2.4.1 Zucht der Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} - Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäuse gehören zum Stamm C57BL/6NCr1 und wurden uns von Prof. René St-Arnaud zur Verfügung gestellt. Im *Cyp27b1*-Gen der Cyp27b1^{-/-} -Tiere wurde das Exon 8 deletiert, welches die Häm-Bindungsdomäne codiert¹⁴⁵. Dies hat zur Folge, dass keine funktionell-aktive 1 α -Hydroxylase gebildet werden kann und dementsprechend kein endogenes Calcitriol verfügbar ist. Infolgedessen sind weibliche homozygote Cyp27b1^{-/-} -Mäuse unfruchtbar¹⁵⁰. Dies führt dazu, dass für die Zucht ausschließlich heterozygote Cyp27b1^{+/-} -Mäuse eingesetzt wurden, was eine Genotypisierung der Nachkommen erforderlich machte.

Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen in einem 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus. Räume und Käfige entsprachen hinsichtlich ihrer Einrichtung, Klimatisierung und Belegungsdichte den Empfehlungen

der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS). Futter und Wasser waren *ad libidum* verfügbar. Alle durchgeführten tierexperimentellen Arbeiten erfolgten gemäß dem Tierschutzgesetz und wurden zuvor vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt (G0026/09 und G0363/10).

5.2.4.2 Genotypisierung der Mäuse

Zur Bestimmung des Genotyps wurden Schwanzspitzenbiopsien der zu testenden Mäuse mit Proteinase K lysiert und die DNA mittels des NucleoSpin® Tissue-Kits gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurde eine PCR mit darauf folgender Gelelektrophorese durchgeführt. Im Fall von Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp-Tieren ergab sich eine Bande von ca. 1400 bp und bei homozygoten Cyp27b1^{-/-}-Tieren eine Bande von ca. 800 bp. Bei heterozygoten Cyp27b1^{+/-}-Tieren fanden sich dementsprechend beide Banden.

| Primer | Sequenz |
|-----------------|----------------------------|
| Cyp27b1 gen for | 5'-cctgttcctcaggtatcca-3' |
| Cyp27b1 gen rev | 5'-cctggctcaggtagcacttc-3' |

Tabelle 9: Sequenzen der Genotypisierungsprimer.

| Zusammensetzung | Volumen pro Probe | Endkonzentration |
|-------------------------|---------------------|------------------|
| 10 x GenTherm Puffer | 2,5 µl | 1 x |
| 50 mM MgCl ₂ | 1,25 µl | 2,5 mM |
| 10 mM desoxyNTPs | 0,25 µl | 100 nM |
| 10 µM forward Primer | 0,5 µl | 200 nM |
| 10 µM reverse Primer | 0,5 µl | 200 nM |
| 5 U/µl DNA-Polymerase | 0,25 µl | 0,05 U/µl |
| DNA | 2 µl | |
| dH ₂ O | auf 25 µl auffüllen | |

Tabelle 10: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Genotypisierung.

| Schritt | Temperatur | Dauer | Wiederholungen |
|------------------------|------------|--------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 2 min | 1 x |
| Denaturierung | 94 °C | 20 s | |
| Primerhybridisierung | 65 °C | 30 s | 40 x |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |
| Finale Elongation | 72 °C | 10 min | 1 x |
| | 4 °C | | bis zum Ende |

Tabelle 11: Aufbau des PCR-Programms zur Genotypisierung.

Zu 25 µl des PCR-Produktes wurden 2,5 µl 10 x Ladepuffer hinzugefügt und mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel (2 %), dem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beigefügt wurde, aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und die Banden zur Bestimmung des Genotyps ausgewertet.

5.2.4.3 Vitamin D-freie Diät

Aufgrund des Vitamin D-Mangels entwickeln Cyp27b1^{-/-}-Mäuse Symptome von Pseudo-Vitamin D-Defizienz-Rachitis (PDDR) mit sekundärem Hyperparathyreoidismus, Wachstumsverzögerung, Hypotonie, Rachitis und Osteomalazie. Um dies zu verhindern erhielten die Cyp27b1^{-/-}-Tiere Vitamin D-freies Futter, angereichert mit 2 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Laktose¹⁴⁸.

5.2.4.4 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *Vena facialis* mittels einer Lanzette. Das entnommene Blut (max. 200 µl) wurde in einem Microtainer®-Röhrchen aufgefangen, bei 12000 x g 2 min zentrifugiert und das erhaltene Blutplasma bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

5.2.4.5 Bestimmung des 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃-Plasmaspiegels

Zur Überprüfung der Konzentration von 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) im Blutplasma von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen wurde jeweils sechs Tieren

Blut entnommen und das daraus gewonnene Plasma von der Firma Immundiagnostik analysiert.

5.2.4.6 T-Zell-abhängige Sensibilisierung

Der tierexperimentelle Teil des folgenden Versuchs wurde von Dr. Kerstin Geldmeyer durchgeführt.

Die Sensibilisierung der weiblichen Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tiere und ihrer ebenfalls weiblichen Cyp27b1^{+/+}-Pendants erfolgte durch drei intraperitoneale (i.p.) Injektionen mit je 10 µg OVA adsorbiert an 1,5 mg Aluminiumhydroxid (Alum) in jeweils 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung an den Tagen 0, 14 und 21. Der Boost am Tag 50 des Experiments wurde ebenfalls intraperitoneal mit 10 µg OVA in 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt. Zur Verstärkung der humoralen Immunantwort wurde an den Versuchstagen 58 und 99 eine Injektion mit 100 µg OVA in je 20 µl 0,9 % NaCl-Lösung intradermal (i.d.) in das Ohr der zuvor mit Isofluran narkotisierten Tiere verabreicht. Am Tag 100 wurden die Tiere unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet und Blut sowie Organe zur späteren Analyse entnommen und auf Eis gelagert (Abb. 5).

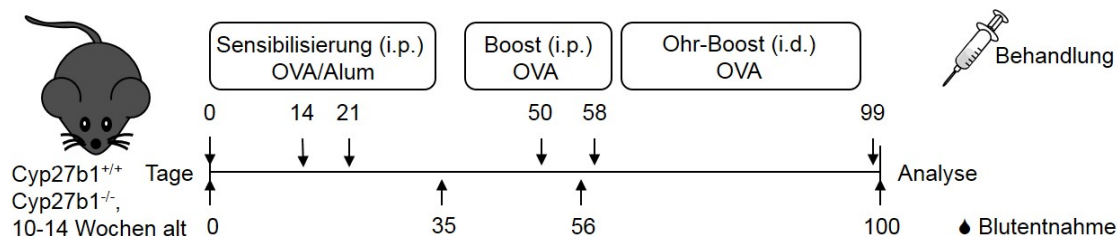


Abb. 5: Versuchsablauf der T-Zell-abhängigen Sensibilisierung.

An den Tagen 0, 14 und 21 erfolgte die Sensibilisierung der ausschließlich weiblichen Tiere durch Injektion von 10 µg OVA adsorbiert an 1,5 mg Aluminiumhydroxid (Alum) in jeweils 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung intraperitoneal (i.p.). Der Boost am Tag 50 erfolgte mit 10 µg OVA in 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung und wurde ebenfalls intraperitoneal (i.p.) verabreicht. An den Tagen 58 und 99 des Experiments erhielten die Mäuse eine Injektion mit 100 µg OVA in je 20 µl 0,9 % NaCl-Lösung intradermal (i.d.) ins Ohr. An den Tagen 0, 35 und 56 wurde Blut zur späteren Analyse entnommen. Die Mäuse wurden am Tag 100 getötet und Blut sowie Organe entnommen.

5.2.4.7 Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Der folgende Versuch wurde in Kooperation mit Dr. Sebastian Rausch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Hartmann vom Institut für Immunologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Die primäre Infektion der sowohl weiblichen als auch männlichen Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tiere mit dem intestinalen Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri* erfolgte am Tag 0 des Experiments durch orale Gabe von je 200 L3-Larven mittels Schlundsonde. Zum Abbruch der Infektion erhielten die Tiere am Tag 14 oral je 2,5 mg des Anthelminthikums Pyrantel pamoate gelöst in 150 µl H₂O. Der Erfolg der Behandlung wurde durch die Untersuchung der Faeces der behandelten Tiere auf die Abwesenheit von Parasiteneiern hin mittels MacMaster-Zählkammer bestätigt¹⁶². Am Tag 76 erfolgte eine sekundäre Infektion mit je 200 L3-Larven. Um die durch die Primärinfektion erworbene Protektion der Tiere bei einer sekundären Infektion zu ermitteln, erhielten ebenfalls am Tag 76 bisher naive Tiere eine primäre Infektion mit je 200 L3-Larven. Am Tag 90 des Experiments wurden alle Tiere unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet, das Blut sowie Organe entnommen und zur späteren Analyse auf Eis gelagert (Abb. 6). Als parasitologische Erhebungsparameter wurden die Anzahl der Nematodeneier in den Faeces der Mäuse (EPG), die Wurmlast im Darm der Mäuse sowie die Fekundität der weiblichen *H.p. bakeri* bestimmt.

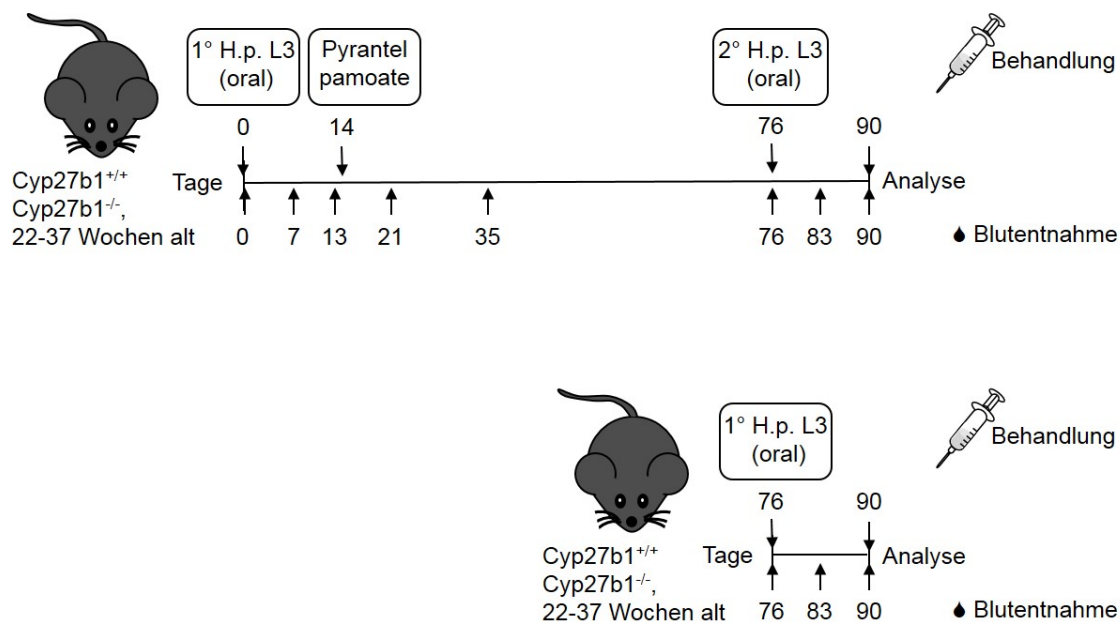


Abb. 6: Versuchsablauf der Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri*.

Am Tag 0 wurden die weiblichen und männlichen Mäuse durch orale Gabe von je 200 L3-Larven infiziert und die Infektion am Tag 14 durch Gabe des Anthelminthikums Pyrantel pamoate abgebrochen. Eine zweite Infektion mit je 200 L3-Larven erfolgte am Tag 76 ebenso wie eine erste Infektion naiver Tiere mit je 200 L3-Larven. Zur Untersuchung des Einflusses des Vitamin D-Status auf die Wurminfektion wurden die Mäuse am Tag 90 getötet und Blut sowie Organe entnommen. H.p., *Heligmosomoides polygyrus bakeri*.

5.2.5 Parasitologische Methoden

5.2.5.1 Anzahl der Nematodeneier in den Faeces der infizierten Mäuse

Zur Bestimmung der Anzahl der Nematodeneier in den Faeces der infizierten Mäuse wurde der Kot der Tiere eingesammelt und gewogen. Anschließend wurden die Eier mit H₂O und gesättigter NaCl-Lösung isoliert und deren Anzahl mittels einer MacMaster-Zählkammer unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung bestimmt. Die Auswertung der Resultate erfolge als Eier pro Gramm Faeces (EPG).

5.2.5.2 Wurmlast der infizierten Mäuse

Zur Bestimmung der Wurmlast wurde nach dem Töten der Mäuse durch zervikale Dislokation deren Dünndarm geöffnet und die Anzahl der darin enthaltenen *H.p. bakeri* bestimmt.

5.2.5.3 Fekundität der weiblichen *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Die Bestimmung der Fekundität erfolgte am Versuchsende am Tag 90. Dazu wurden pro Maus 5-8 weibliche Nematoden aus dem Dünndarm der infizierten Tiere entnommen, für 24 h in einer 96-well-Zellkulturplatte kultiviert und anschließend die Anzahl der in diesem Zeitraum produzierten Eier bestimmt.

5.2.6 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Das Vorliegen einer Gaußschen Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson-Normalverteilungstest überprüft. Zur Untersuchung unabhängiger Stichproben wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung ein ungepaarter T-Test mit Welch-Korrektur und bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt. Abhängige Stichproben wurden bei Normalverteilung mit dem T-Test für abhängige Stichproben untersucht, nicht normalverteilte abhängige Stichproben mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die zeitlichen Verläufe der Immunglobuline wurden mittels Two-way ANOVA und dem Sidak-Post-hoc Test überprüft. Als statistisch signifikant wurde ein p -Wert $\leq 0,05$ bewertet. Signifikanzen sind, wenn vorhanden, in den jeweiligen Abbildungen durch Sterne (*) kenntlich gemacht.

6 Ergebnisse

6.1 Expression von Cyp27b1, VDR und Cyp24a1 bei murinen B- und T-Lymphozyten

Im Verlauf der Biosynthese von Vitamin D₃ kommt es durch die Wirkung von UV-B-Strahlung über zahlreiche Zwischenschritte zur Bildung des biologisch inaktiven 25-Hydroxyvitamin D₃ (Calcidiol). Dieses wird durch die 1 α -Hydroxylase-Aktivität des Enzyms CYP27B1 zum biologisch aktiven 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) umgewandelt, das seine Wirkung durch Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt. Der Abbau von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ geschieht durch die 24-Hydroxylase-Aktivität des Enzyms CYP24A1 (Abb. 3). Die Analyse der mRNA- sowie Proteinexpression der am Vitamin D-Stoffwechsel beteiligten Komponenten Cyp27b1, VDR und Cyp24a1 durch stimulierte CD19⁺ B- und CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR bzw. Western-Blot.

Der Nachweis der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten durch die eingesetzten Stimulantien erfolgte nach Färbung der Aktivierungsmarker CD69, CD86 und CD137 auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (Anhang Abb. II, Anhang Abb. III, Anhang Tab. I, Anhang Tab. II).

Die Untersuchung der mRNA-Expression der für den Vitamin D-Stoffwechsel relevanten Gene *Cyp27b1*, *Vdr* und *Cyp24a1* bei frisch isolierten (*ex vivo*) und mit anti-CD40 und IL-4 stimulierten CD19⁺ B-Lymphozyten sowie bei frisch isolierten (*ex vivo*) und mit anti-CD3 und anti-CD28 stimulierten CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Die Stimulationsdauer lag bei 24 h, 48 h sowie 120 h. Dabei zeigte sich, dass *Cyp27b1*-mRNA von frisch isolierten (*ex vivo*) CD19⁺ B-Lymphozyten exprimiert wurde, die mRNA-Menge jedoch nach 24-stündiger Stimulation auf das 2,4-Fache anstieg. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 48-stündiger Stimulation ein Expressionsniveau ähnlich dem frisch isolierter (*ex vivo*) CD19⁺ B-Zellen. CD19⁺ B-Lymphozyten, die 120 h stimuliert wurden, zeigten eine sehr geringe Expression von *Cyp27b1*-mRNA, die unterhalb des Ausgangsniveaus lag (Abb. 7a). Eine mRNA-Expression von *Vdr* und *Cyp24a1* war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in CD19⁺ B-Zellen nachweisbar (Abb. 7b, c).

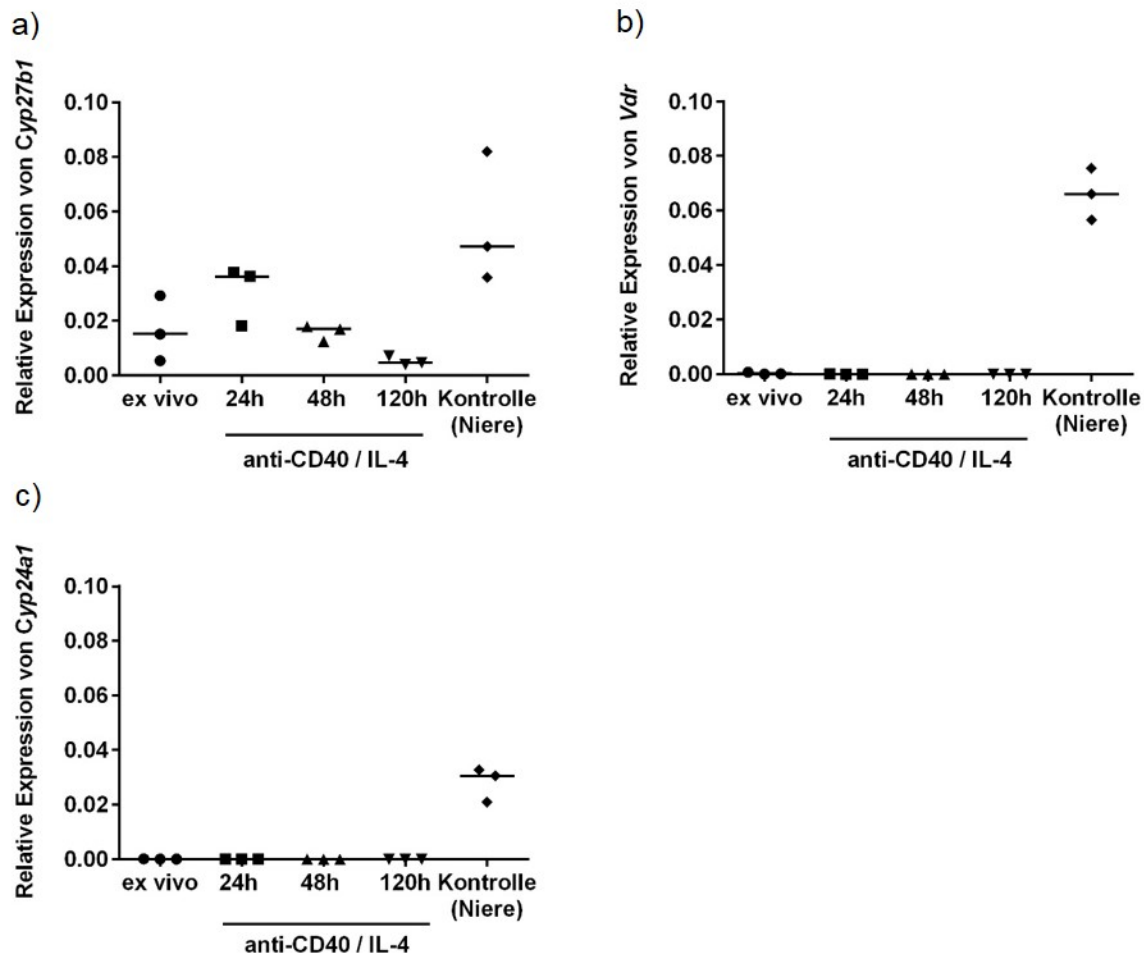


Abb. 7: Expression der mRNA von *Cyp27b1*, *Vdr* und *Cyp24a1* bei CD19⁺ B-Lymphozyten.

CD19⁺ B-Zellen wurden mittels MACS aus murinen Splenozyten isoliert und mit 10 µg/ml anti-CD40 und 20 ng/ml IL-4 für 24 h, 48 h und 120 h stimuliert. Als Kontrolle dienten aus murinen Nieren gewonnene Zelllysate. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der mRNA, deren Umschreibung in cDNA und die Messung der Genexpression von a) *Cyp27b1*, b) *Vdr* und c) *Cyp24a1* mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median (n=3).

Die Untersuchung der mRNA-Synthese von *Cyp27b1* bei CD4⁺ T-Lymphozyten zeigte bereits bei frisch isolierten (*ex vivo*) Zellen eine Expression. 24 h nach Beginn der Stimulation war ein um das 6-Fache angestiegenes Expressionsniveau messbar, das nach 48-stündiger bzw. 120-stündiger Stimulation auf das Anfangsniveau zurückfiel (Abb. 8a). Wie zuvor bei CD19⁺ B-Lymphozyten war auch bei CD4⁺ T-Zellen keine Expression von *Vdr*- und *Cyp24a1*-mRNA nachweisbar. Lediglich nach 120-stündiger Stimulation war ein minimaler Anstieg der *Vdr*- und *Cyp24a1*-Expression zu erkennen (Abb. 8b, c).

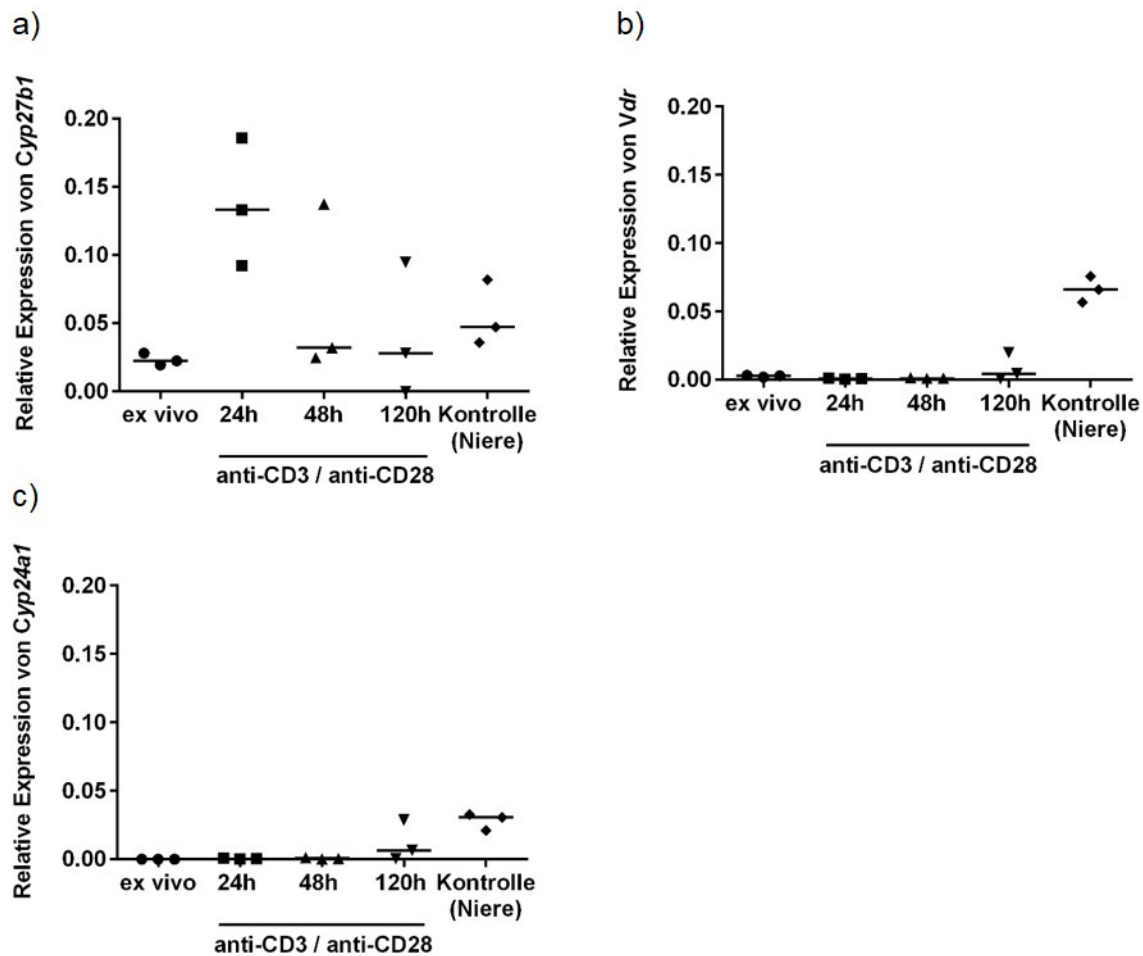


Abb. 8: Expression der mRNA von *Cyp27b1*, *Vdr* und *Cyp24a1* bei $CD4^+$ T-Lymphozyten.

$CD4^+$ T-Zellen wurden mittels MACS aus murinen Splenozyten isoliert und mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD28 für 24 h, 48 h und 120 h stimuliert. Als Kontrolle dienten aus murinen Nieren gewonnene Zelllysate. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der mRNA, deren Umschreibung in cDNA und die Messung der Genexpression von a) *Cyp27b1*, b) *Vdr* und c) *Cyp24a1* mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median ($n=3$).

Der Nachweis der Proteinmenge von CYP27B1 und VDR bei stimulierten $CD19^+$ B- und $CD4^+$ T-Lymphozyten erfolgte mittels Western-Blot. Als Stimulationsdauer wurden 48 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die größte Menge der nachzuweisenden Proteine erwartet wurde. Es wurden Zelllysate frisch isolierter (*ex vivo*) Zellen, 48 h-unstimulierter und 48 h-stimulierter Zellen untersucht.

CYP27B1 konnte bereits bei frisch isolierten (*ex vivo*) $CD19^+$ B- und $CD4^+$ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Dies war auch bei unstimulierten B- und T-Zellen der Fall, wenn auch bei B-Zellen in stärkerem Maße. Auch bei stimulierten $CD19^+$ B- und $CD4^+$ T-Lymphozyten war eine Proteinexpression von CYP27B1

erkennbar. Dabei war zu beobachten, dass die Expression von CYP27B1 bei CD19⁺ B-Zellen annähernd gleichbleibend war. CD4⁺ T-Zellen hingegen zeigten eine Zunahme der CYP27B1-Expression von *ex vivo* und 48 h-unstimuliert bis zu 48 h-stimuliert.

Die Proteinexpression von VDR durch stimulierten CD19⁺ B-Lymphozyten war, anders als zuvor auf mRNA-Niveau, im Western-Blot sehr deutlich erkennbar. Auch stimulierte CD4⁺ T-Zellen zeigten eine, wenn auch sehr schwache Expression des VDR (Abb. 9).

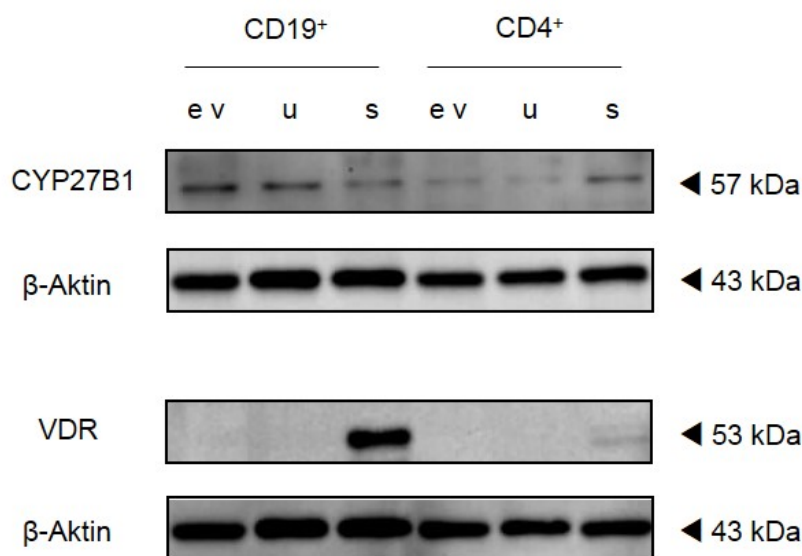


Abb. 9: Proteinexpression von CYP27B1 und VDR bei CD19⁺ B- und CD4⁺ T-Lymphozyten.

ev, *ex vivo*; u, 48 h-unstimuliert; s, 48 h-stimuliert

CD19⁺ B- und CD4⁺ T-Zellen wurden mittels MACS aus murinen Splenozyten isoliert und mit 10 µg/ml anti-CD40 und 20 ng/ml IL-4 bzw. 3 µg/ml anti-CD3 und 1 µg/ml anti-CD28 für 48 h stimuliert. Zur Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blots wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

6.2 Verlauf der humoralen Immunantwort in einem Vitamin D-defizienten Maus-Modell

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass Calcitriol die Bildung des Immunglobulins E unterdrücken kann^{128, 130}. Um dies *in vivo* in einem T-Zell-abhängigen Sensibilisierungsmodell zu überprüfen, wurden Vitamin D-defiziente Cyp27b1^{-/-}-Tiere und ihre Cyp27b1^{+/+}-Pendants mit OVA sensibilisiert und die humorale Immunantwort untersucht (siehe Versuchsaufbau Abb. 5).

6.2.1 Humorale Immunantwort nach Sensibilisierung mit Ovalbumin

Beide Genotypen, Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tiere, zeigten schon vor Beginn der Sensibilisierung messbare Konzentrationen der untersuchten Gesamt-Immunglobulin-Isotypen G₁, E und A (Abb. 10a-c), wobei IgG₁ am Stärksten vertreten war (Abb. 10a).

Das mittlere Niveau des Gesamt-IgG₁-Konzentration erreichte bei den Cyp27b1^{+/+}-Tieren einen maximalen Wert von $1,8 \times 10^6$ ng/ml am Tag 35, während dies bei den Cyp27b1^{-/-}-Mäusen mit $2,7 \times 10^6$ ng/ml am Tag 56 der Fall war. Ebenfalls am Tag 56 war bei der Cyp27b1^{-/-}-Gruppe die IgG₁-Konzentration im Vergleich zu den Cyp27b1^{+/+}-Tieren um 154 % signifikant erhöht ($p < 0,001$) (Abb. 10a).

Bereits vor Beginn der Sensibilisierung zeigten sich bei den Cyp27b1^{-/-}-Mäusen höhere Gesamt-IgE-Werte als bei den Cyp27b1^{+/+}-Pendants ($p = 0,06$). Dies setzte sich im weiteren Versuchsverlauf fort. Jedoch war erst am Tag 100 ein, mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$, 6-fach erhöhter Wert gegenüber den Cyp27b1^{+/+}-Tieren nachweisbar (Abb. 10b).

Die Gesamt-IgA-Werte beider Genotypen wiesen über den gesamten Versuchsverlauf von 100 Tagen nur leichte Schwankungen auf. Jedoch waren die Gesamt-IgA-Werte der Cyp27b1^{-/-}-Tiere am Tag 100 im Vergleich zur Cyp27b1^{+/+}-Gruppe 2-fach und signifikant erhöht ($p < 0,05$) (Abb. 10c).

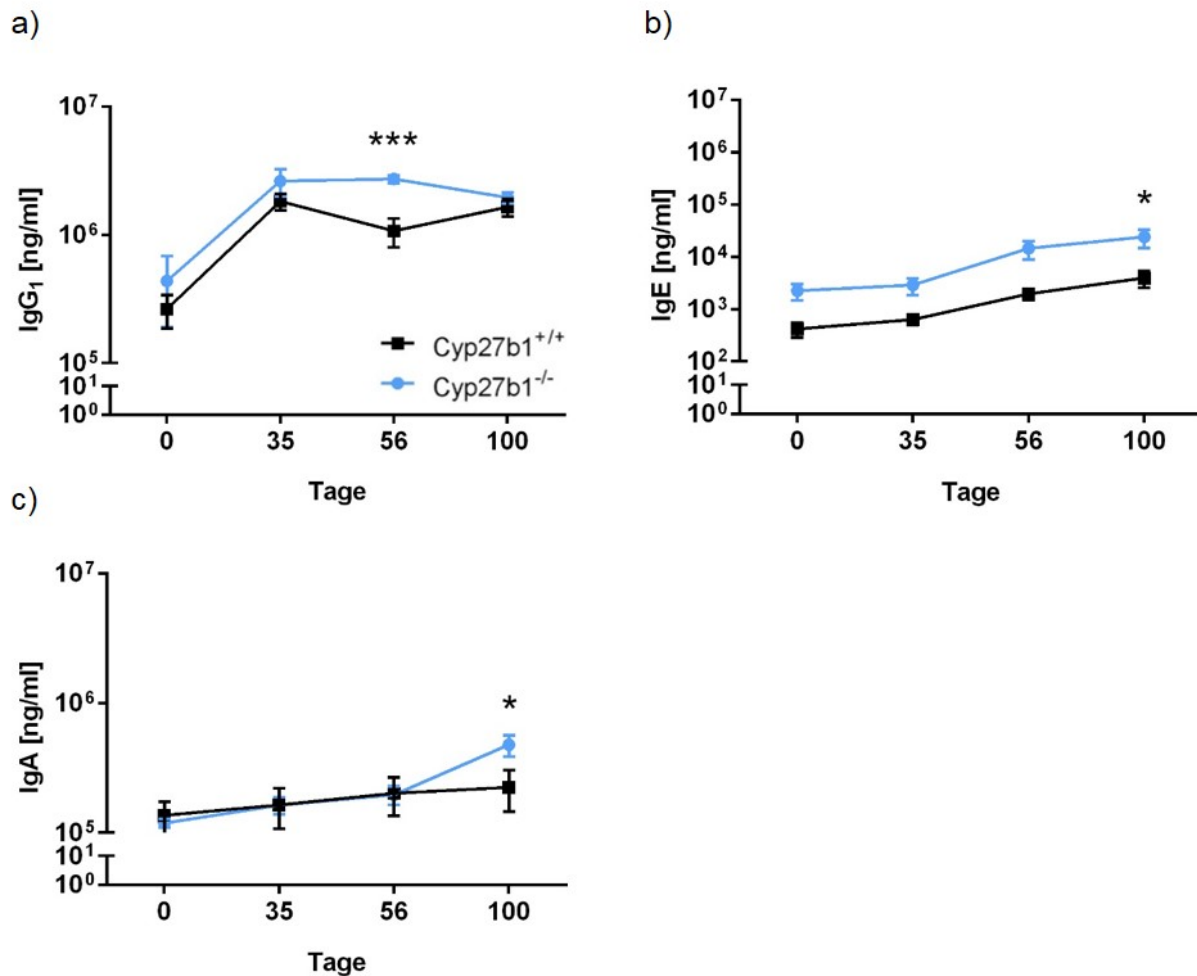


Abb. 10: Verlauf der humoralen Immunantwort bei OVA-sensibilisierten Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäusen.

Die Sensibilisierung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektionen von 10 µg OVA/Alum an den Tagen 0, 14 und 21. Am Tag 50 wurde ein intraperitonealer Boost mit 10 µg OVA verabreicht und an den Versuchstagen 58 und 99 des Experiments erhielten die Mäuse eine Injektion mit 100 µg OVA intradermal (i.d.) in das Ohr. An den Tagen 0, 35, 56 und am Versuchsende am Tag 100 wurden Blutproben gewonnen und zur Messung von a) IgG₁, b) IgE und c) IgA mittels ELISA verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert +/- SEM von 5-9 Tieren pro Gruppe ($p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***).

6.2.2 Allergen-spezifisches Immunglobulinprofil nach Sensibilisierung mit Ovalbumin

In keiner der beiden Versuchsgruppen war vor Beginn der Sensibilisierung mit OVA ein Allergen-spezifischer Immunglobulin-Isotyp nachweisbar (Abb. 11a-c).

Die OVA-IgG₁-Antwort erreichte ihr Maximum in beiden Genotypen am Tag 35 mit 8632 µg/ml bei den Cyp27b1^{+/+} - bzw. 11506 µg/ml bei den Cyp27b1^{-/-} -Tieren und fiel danach ab. Die Absenkung der OVA-IgG₁-Werte nach Tag 56 war bei Cyp27b1^{+/+} -

Tieren stärker ausgeprägt. Daher zeigten die Cyp27b1^{-/-}-Mäuse am Tag 100 tendenziell höhere OVA-IgG₁-Konzentration verglichen mit Cyp27b1^{+/+}-Tieren (Abb. 11a).

Ein ähnlicher Verlauf war für Allergen-spezifische IgE-Antikörper zu beobachten. Nach einem starken Anstieg in beiden Gruppen bis Tag 56, folgte eine Verminderung bei der Cyp27b1^{+/+}-Gruppe während das Niveau bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren annähernd konstant blieb. Somit zeigten die Cyp27b1^{-/-}-Tiere am Tag 100 eine im Vergleich zu den Cyp27b1^{+/+}-Tieren tendenziell höhere OVA-spezifische IgE-Konzentration ($p=0,06$) (Abb. 11b).

Die Messungen der OVA-spezifischen IgA-Werte deckten größere Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren eines Genotyps untereinander auf. So lagen die Werte am Tag 100 bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren zwischen 1483 LU/ml und 167000 LU/ml und bei den Cyp27b1^{+/+}-Tieren zwischen 609 LU/ml und 20400 LU/ml. Dennoch zeigte sich am Tag 100 bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren ein 7,8-fach erhöhter OVA-spezifischer IgA-Wert verglichen mit den Cyp27b1^{+/+}-Tieren (Abb. 11c).

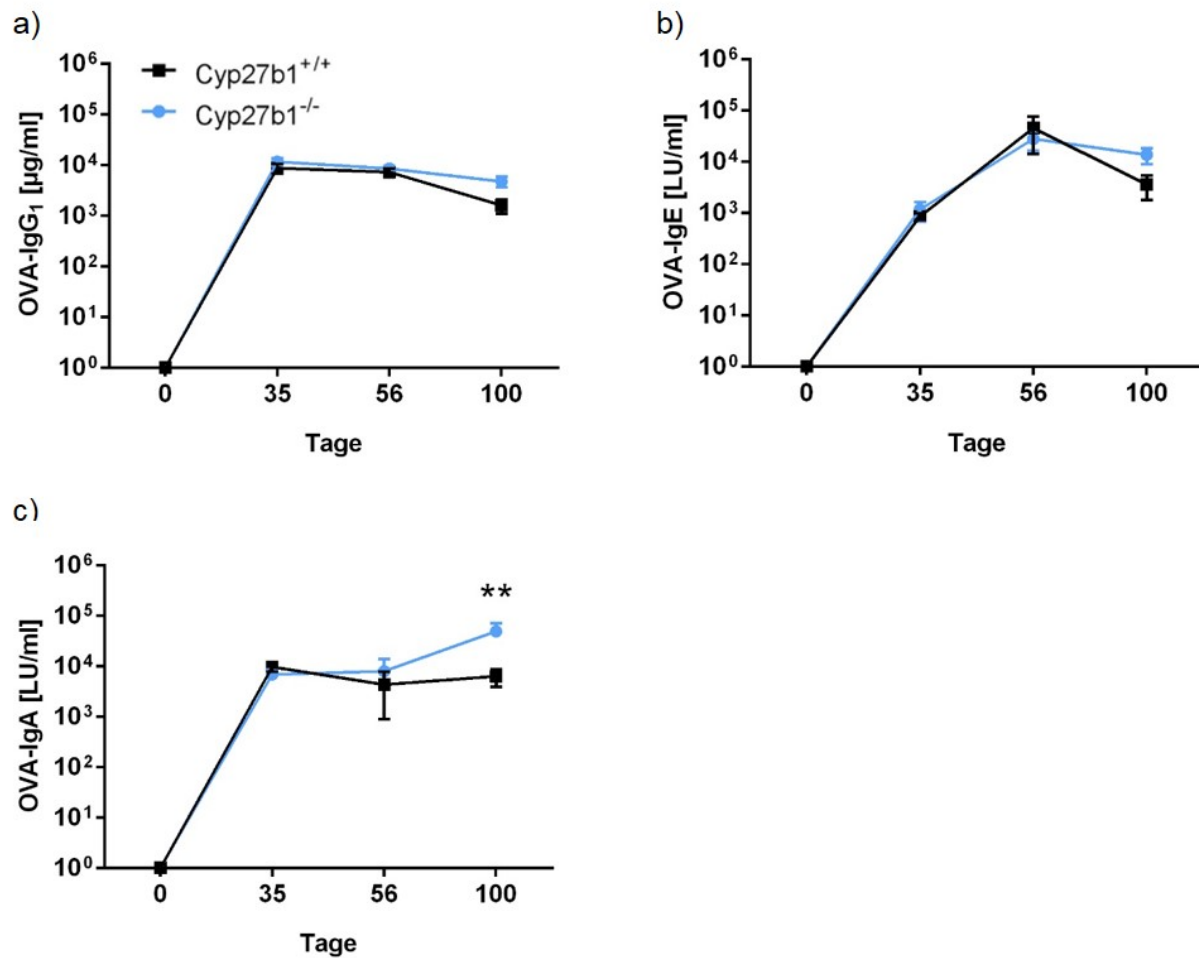


Abb. 11: Verlauf der antigenspezifischen Immunglobulinwerte bei OVA-sensibilisierten Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäusen.

Die Sensibilisierung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektionen von 10 µg OVA/Alum an den Tagen 0, 14 und 21. Am Tag 50 wurde ein intraperitonealer Boost mit 10 µg OVA verabreicht und an den Versuchstagen 58 und 99 des Experiments erhielten die Mäuse eine Injektion mit 100 µg OVA intradermal (i.d.) in das Ohr. An den Tagen 0, 35, 56 und am Versuchsende am Tag 100 wurden Blutproben gewonnen und zur Messung von OVA-spezifischem a) IgG₁, b) IgE und c) IgA mittels ELISA verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert +/- SEM von 6-9 Tieren pro Gruppe ($p < 0,01$ **).

6.3 Einfluss der Vitamin D₃-Supplementierung auf die Bildung autoreaktiver Antikörper

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass ein Mangel an Vitamin D mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen assoziiert sein kann^{163, 164}.

Bei den von uns verwendeten Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Mäusen konnte übereinstimmend damit eine verstärkte humorale Immunantwort festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob es bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren darüber hinaus zu einer verstärkten Bildung autoreaktiver Antikörper gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene kommt, wurde Blutplasma von vier Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Vitamin D₃-Supplementierung (Cholecalciferol) mittels Hep2-Tests dahin gehend getestet.

Die vier Versuchsgruppen umfassten Cyp27b1^{-/-}- und Cyp27b1^{+/+}-Tiere ohne Vitamin D₃ im Futter, Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer regulären Vitamin D₃-Zufuhr (1 kU/kg Futter) und Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer 10-fachen Zufuhr von Vitamin D₃ (10 kU/kg Futter).

Die Daten zeigen, dass das Blutplasma der Gruppe der Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer regulären Zufuhr von Vitamin D₃ (1 kU/kg Futter) bei allen getesteten Tieren sowohl in der Verdünnungsstufe 1:100 als auch bei 1:400 autoreaktive Antikörper aufwies. In der Gruppe der Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tiere ohne Vitamin D₃-Zufuhr waren bei einer Verdünnung des Blutplasma von 1:100 bei drei von vier untersuchten Mäusen Autoantikörper nachweisbar, ebenso bei einer Verdünnung von 1:400. Von den fünf untersuchten Cyp27b1^{+/+}-Tieren ohne Vitamin D₃-Zufuhr zeigten zwei Tiere bei einer Verdünnung von 1:100 ein positives Signal während in der Gruppe der fünf getesteten Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer 10-fachen Zufuhr von Vitamin D₃ bei keinem der untersuchten Tiere Autoantikörper nachweisbar waren (Abb. 12).

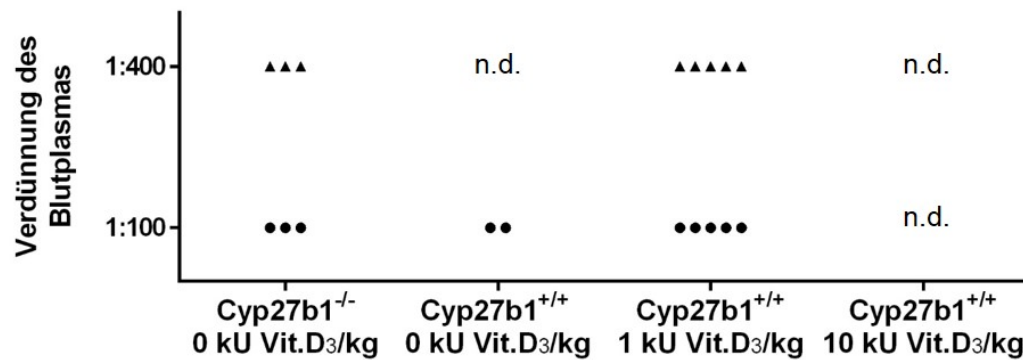


Abb. 12: Nachweis autoreaktiver Antikörper gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene im Blutplasma von Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D₃-Supplementierung.

Es wurden vier Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Vitamin D₃-Supplementierung untersucht: Cyp27b1^{-/-}-Tiere (n=4) und Cyp27b1^{+/+}-Tiere (n=5) ohne Vitamin D₃ im Futter, Cyp27b1^{+/+}-Mäuse (n=5) mit einer normalen Zufuhr von Vitamin D₃ (1 kU/kg Futter) und Cyp27b1^{+/+}-Mäuse (n=5) mit einer 10-fachen Zufuhr von Vitamin D₃ (10 kU/kg Futter). Das Blutplasma jedes Tieres wurde in den Verdünnungsstufen 1:100 und 1:400 auf die mit HEp2-Zellen versehenen Objektträger gegeben und durch Zugabe FITC-konjugierter anti-muriner Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert positive Fluoreszenzsignale einer einzelnen Maus bei der angegebenen Verdünnung der Blutplasmas (n=4-5). n. d., nicht detektierbar; Vit.D₃, Cholecalciferol.

Wie in Abb. 13 dargestellt, wurden durch das Vorhandensein autoreaktiver Antikörper verschiedene zelluläre Strukturen detektiert. Neben Färbungen des Nukleus (Abb. 13a, d, e) und des Nukleolus (Abb. 13b) fanden sich positive Signale im Zytoplasma (Abb. 13c, f) von Hep2-Zellen.

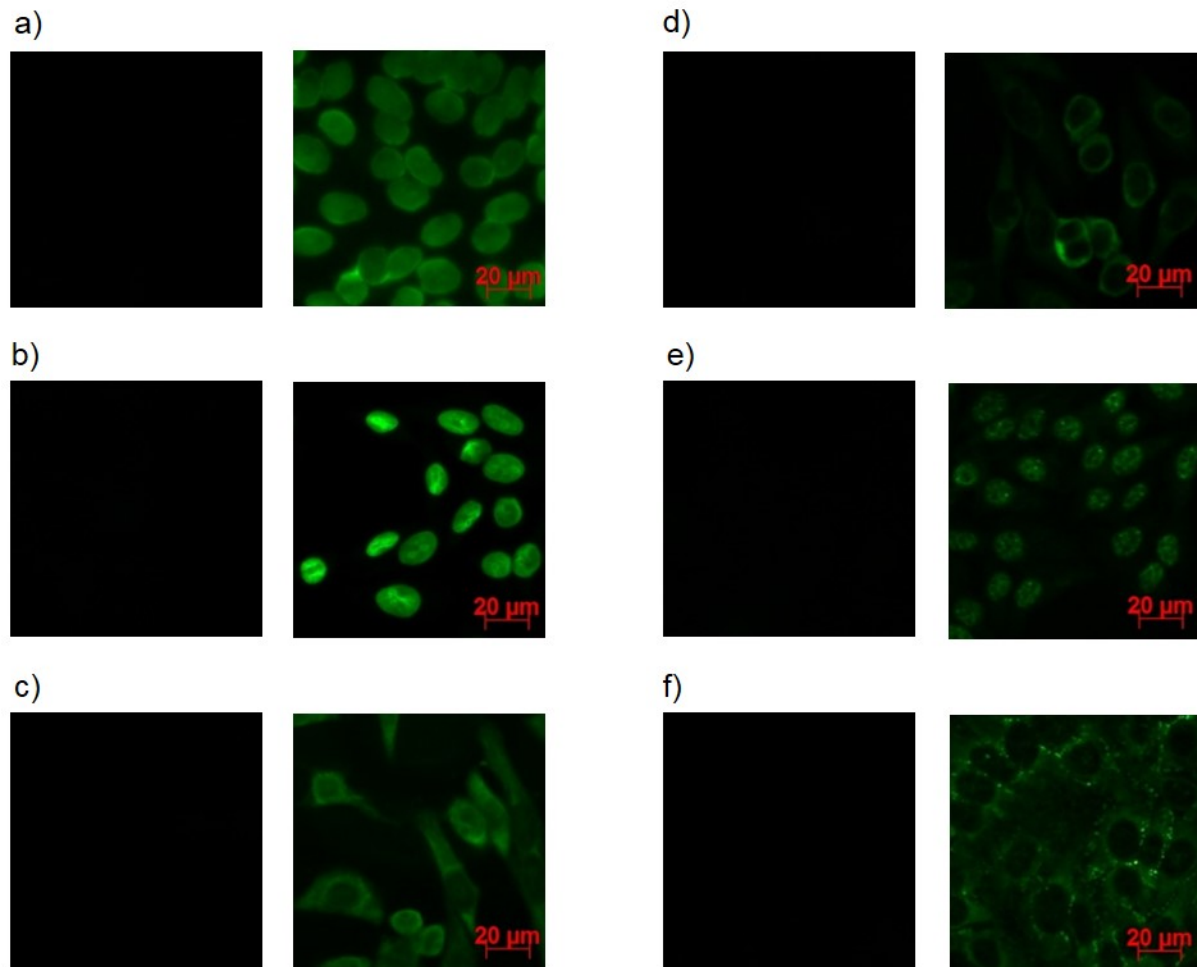


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung autoreaktiver Antikörper gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene im Blutplasma von Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D₃-Supplementierung.

Zum Nachweis autoreaktiver Antikörper im Blutplasma wurden vier Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Vitamin D₃-Supplementierung untersucht: Cyp27b1^{-/-}-Tiere und Cyp27b1^{+/+}-Tiere ohne Vitamin D₃ im Futter, Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer normalen Zufuhr von Vitamin D₃ (1 kU/kg Futter) und Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer 10-fachen Zufuhr von Vitamin D₃ (10 kU/kg Futter). Das Blutplasma jedes Tieres wurde in den Verdünnungsstufen 1:100 und 1:400 auf die mit HEp2-Zellen versehenen Objektträger gegeben und durch Zugabe FITC-konjugierter anti-muriner Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (n=4-5). Als Negativkontrolle diente das Blutplasma einer naiven C57BL/6-Maus. Auf der linken Seite (a-f) befindet sich jeweils die Negativkontrolle zur rechts abgebildeten getesteten Probe; Vitamin D₃, Cholecalciferol.

- a) Cyp27b1^{-/-} / 0 kU Vitamin D₃/kg Futter, 1:100, homogene Färbung des Nukleus (Histone und doppelsträngige DNA)
- b) Cyp27b1^{-/-} / 0 kU Vitamin D₃/kg Futter, 1:100, homogene Färbung von Nukleus und Nukleolus
- c) Cyp27b1^{-/-} / 0 kU Vitamin D₃/kg Futter, 1:100, Färbung des Zytoplasmas
- d) Cyp27b1^{+/+} / 1 kU Vitamin D₃/kg Futter, 1:100, Färbung des Nukleus mit Rand
- e) Cyp27b1^{+/+} / 1 kU Vitamin D₃/kg Futter, 1:400, Färbung des Nukleus mit Sprenkeln
- f) Cyp27b1^{+/+} / 1 kU Vitamin D₃/kg Futter, 1:100, Färbung des Zytoplasmas mit zytoplasmatischen Punkten.

Um zu untersuchen, ob sich die unterschiedliche Vitamin D₃-Supplementation der auf das Vorhandensein autoreaktiver Antikörper getesteten Tiere in unterschiedlichen 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentrationen im Blutplasma der Mäuse widerspiegelt, wurde dieses mittels ELISA analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Mediane der 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentrationen der Cyp27b1^{-/-}- und Cyp27b1^{+/+}-Tiere ohne Vitamin D₃ im Futter sowie der Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer regulären Zufuhr von Vitamin D₃ (1 kU/kg Futter) mit 21-25 ng/ml sehr niedrig waren. Legt man den in der Literatur genannten Wert von >80 nmol/l¹⁶⁵ bzw. >32 ng/ml für eine ausreichende Versorgung mit 25-Hydroxyvitamin D₃ zugrunde, wiesen die Tiere dieser drei Gruppen eine 25-Hydroxyvitamin D₃-Defizienz auf. Der Median der 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentration der Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer 10-fachen Zufuhr von Vitamin D₃ (10 kU/kg Futter) lag bei 58 ng/ml. Somit waren diese Tiere ausreichend mit 25-Hydroxyvitamin D₃ versorgt (Abb. 14).

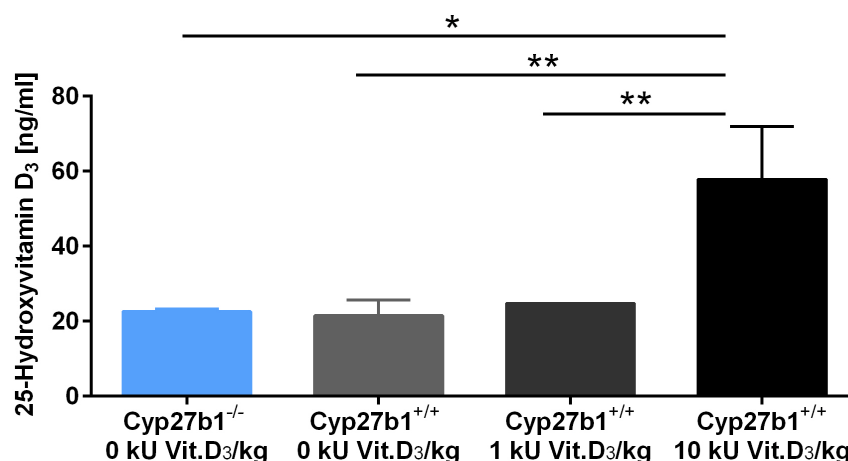


Abb. 14: Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₃ im Blutplasma von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D₃-Supplementierung.

Das Blutplasma der zuvor auf das Vorhandensein autoreaktiver Antikörper getesteten Tiere wurde mittels ELISA hinsichtlich der 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentration untersucht. Die Daten repräsentieren den Median mit Spannweite von 4-5 Mäusen pro Gruppe ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **). Vit.D₃, Cholecalciferol.

6.4 Charakterisierung der Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Mäuse

6.4.1 Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₃ und 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Blutplasma von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen

Neben 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ stellt auch dessen Vorstufe 25-Hydroxyvitamin D₃ einen Liganden des Vitamin D-Rezeptors dar¹⁶⁶. Daher wurden die Konzentrationen beider Metabolite im Blutplasma von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen bestimmt. In der Literatur findet sich für eine ausreichende Versorgung mit 25-Hydroxyvitamin D₃ eine Serumkonzentration von >80 nmol/l¹⁶⁵ bzw. >32 ng/ml. Für 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ gibt die Firma Immundiagnostik einen Referenzbereich von 17-53 pg/ml an.

Der Vergleich von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen hinsichtlich ihrer 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentrationen im Blutplasma zeigte, dass die untersuchten Cyp27b1^{-/-}-Tiere mit einem mittleren Wert von 3,7 ng/ml (Spannweite von 3,5-4,0 ng/ml) einen signifikant niedrigeren 25-Hydroxyvitamin D₃-Spiegel aufwiesen als ihre Cyp27b1^{+/+}-Pendents und somit defizient waren. Die mittlere Plasmakonzentration von 25-Hydroxyvitamin D₃ lag bei den Cyp27b1^{+/+}-Tieren bei 26,5 ng/ml (Spannweite von 21,4-26,5 ng/ml) und befand sich am oberen Rand des defizitären Bereichs (Abb. 15a).

Die Messung der Konzentrationen des bioaktiven Vitamin D₃-Metaboliten 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Blutplasma ergab für alle untersuchten Cyp27b1^{-/-}-Tiere einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze, welche bei 4,8 pg/ml liegt. Der Plasmaspiegel der Cyp27b1^{+/+}-Tiere zeigte einen mittleren Wert von 35,5 pg/ml (Spannweite von 31-63 pg/ml) und lag damit im suffizienten Bereich der 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃-Konzentration (Abb. 15b).

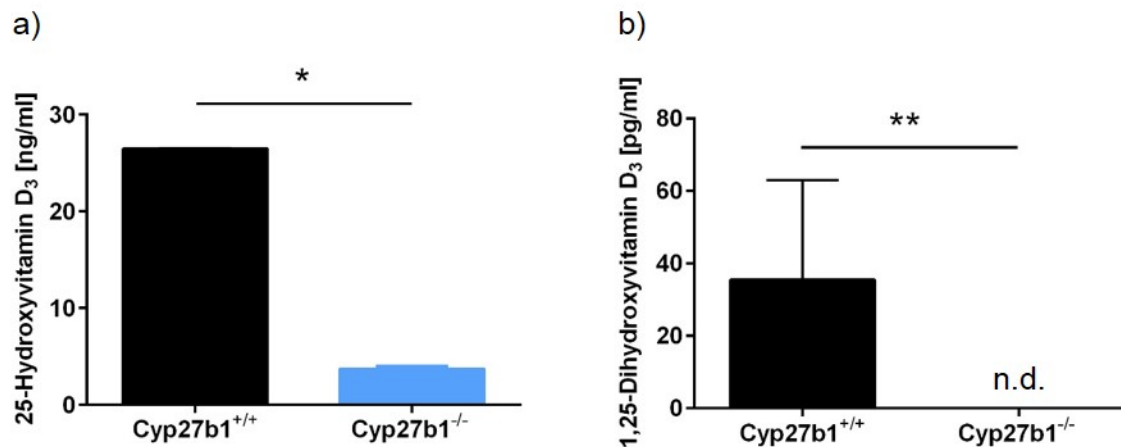


Abb. 15: Konzentration der Vitamin D₃-Metabolite 25-Hydroxyvitamin D₃ und 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Blutplasma von Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäusen.

Die Konzentrationen von a) 25-Hydroxyvitamin D₃ und b) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Blutplasma von Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäusen wurden mittels ELISA bzw. durch die Firma Immundiagnostik analysiert. Die Daten repräsentieren den Median mit Spannweite von 4-6 Mäusen pro Gruppe ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **). n. d., nicht detektierbar.

6.4.2 Körpermasse

Die Entwicklung der Körpermasse von zu Beginn der Messungen 9-13 Wochen alten Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Tieren wurde über einen Zeitraum von acht Wochen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Cyp27b1^{-/-} -Mäuse eine im Mittel 0,7–2,1 g geringere Körpermasse als ihre Cyp27b1^{+/+} -Pendents aufwiesen (Abb. 16).

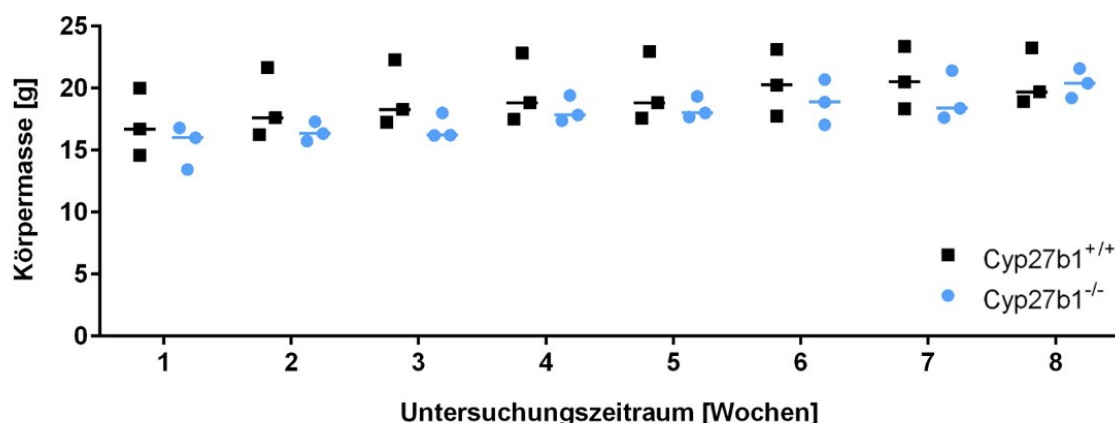


Abb. 16: Gegenüberstellung der Körpermasse von Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäusen.

Über einen Zeitraum von 8 Wochen wurden zu Beginn der Messungen 9-13 Wochen alte Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäuse wöchentlich gewogen. Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median (n=3).

6.4.3 Durchflusszytometrische Analyse der Leukopoese

Die explorative durchflusszytometrische Untersuchung der Leukopoese von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen erfolgte in Kooperation mit Jana Winckler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fritz Melchers vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie. Die Auswertung der Gesamtzellzahlen von Knochenmark, Thymus, Milz und Peritoneum von jeweils drei Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen ergab bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren eine um 17 % verringerte Gesamtzellzahl von Knochenmark und Peritoneum verglichen mit den Cyp27b1^{+/+}-Tieren. Die Zellzahlen von Thymus und Milz waren bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren um 80 % bzw. 57 % verringert (Abb. 17).

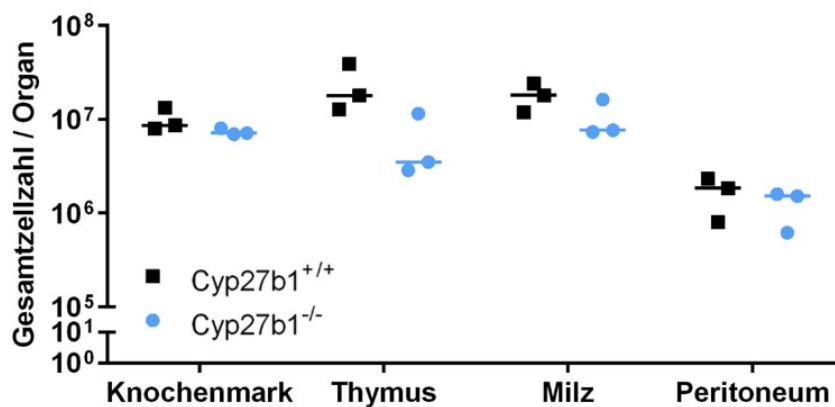


Abb. 17: Vergleich der Gesamtzellzahlen von Knochenmark, Thymus, Milz und Peritoneum von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen.

Die Gesamtzellzahlen von Knochenmark, Thymus, Milz und Peritoneum von 7 Monate alten Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen wurden ermittelt und verglichen. Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median (n=3).

Die Analyse verschiedener Leukozyten-Subpopulationen von B-, T- und myeloiden Zellen in Knochenmark, Thymus, Milz und Peritoneum von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen ergab hinsichtlich ihres Auftretens und ihrer prozentualen Anteile an der Gesamtzellzahl des jeweiligen Organs keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Genotypen (Anhang Tab. III-VI).

Einzig im Knochenmark wiesen einzelne Zellpopulationen der Cyp27b1^{-/-}-Mäuse einen geringeren Anteil an der Gesamtzellzahl des Organs, verglichen mit ihren Cyp27b1^{+/+}-Pendants, auf. So waren Prä-B-1- und Prä-B-2-Zellen bei den untersuchten Cyp27b1^{-/-}-Tieren um 60 % bzw. 61 % verringert und unreife B-Zellen

um 88 %, während gewitchte B-Zellen um 50 % und myeloide Zellen um 25 % verringerte Zellzahlen bei Cyp27b1^{-/-}-Tieren, verglichen mit ihren Cyp27b1^{+/+}-Pendants, aufwiesen (Abb. 18).

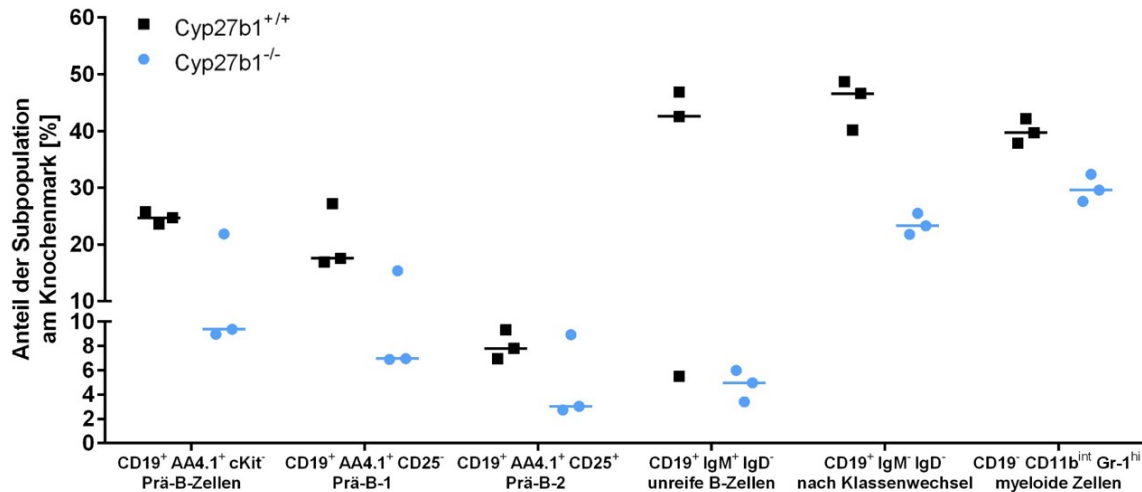


Abb. 18: Abweichende Leukozyten-Subpopulationen bei Cyp27b1^{-/-}-Mäusen.

Prozentuale Anteile verschiedener Leukozyten-Subpopulationen am Knochenmark 7 Monate alter Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäuse, die einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Genotypen aufweisen. Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median (n=3).

6.5 Verlauf der Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri* in einem Vitamin D-defizienten Mausmodell

Die bisher gezeigten Daten weisen auf eine allgemein verstärkte humorale Immunantwort sowie eine erhöhte IgE-Antwort bei den Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Mäusen hin. Daher wurde nachfolgend die mögliche pathophysiologische Bedeutung dieser Ergebnisse anhand eines Wurminfektionsmodells untersucht, da hier ausgeprägte IgE-Antworten auftreten. Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp- und Vitamin D-defiziente Cyp27b1^{-/-}-Mäuse wurden mit dem intestinalen Nematoden *H.p. bakeri* infiziert. Die Infektion wurde nach 14 Tagen medikamentös abgebrochen und die nun *H.p. bakeri*-freien Tiere am Tag 76 des Versuchs erneut mit dem Nematoden infiziert. Um den durch die Primärinfektion erworbenen Schutz während einer Sekundärinfektion im Vergleich zu einer Primärinfektion zu bestimmen, erhielten ebenfalls am Tag 76 bisher unbehandelte Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäuse eine primäre Infektion mit dem Nematoden (siehe Versuchsaufbau Abb. 6).

6.5.1 Humorale Immunantwort nach Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Beide Genotypen, Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tiere, zeigten schon zu Beginn des Versuchs messbare Gesamt-IgG₁-Konzentrationen. Diese stiegen nach den Infektionen mit L3-Larven von *H.p. bakeri* an den Tagen 0 und 76 weiter an und erreichten am Tag 90 ihr Maximum mit einer 16-fachen Steigerung vom Tag 0 zu Tag 90 bei Cyp27b1^{+/+}-Tieren und einer 32-fachen Steigerung für den gleichen Zeitraum bei den Cyp27b1^{-/-}-Mäusen. Zwischen den Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen waren zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Ausprägung der Gesamt-IgG₁-Immunantwort zu erkennen (Abb. 19a).

Die zunächst niedrigen Gesamt-IgE-Werte, mit 3,4 µg/ml bei den Cyp27b1^{+/+}-Mäusen und 2,2 µg/ml bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren, am Tag 0 steigerten sich bei beiden Versuchsgruppen als Antwort auf die Primärinfektion bis Tag 13 stark, und zwar um das 20-Fache bei den Cyp27b1^{+/+}- und das 55-Fache bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren (Abb. 19b). Die Immunantwort auf die Zweitinfektion am Tag 76 erfolgte schneller als die Reaktion auf die Erstinfektion. Im Gegensatz zu IgG₁, welches keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen aufwies, zeigten

die Cyp27b1^{-/-}-Tiere am Tag 90 um 81 % signifikant höhere Gesamt-IgE-Werte als die Cyp27b1^{+/+}-Tiere (Abb. 19b).

Die Untersuchungen der Gesamt-IgA-Spiegel im Blutplasma beider Genotypen zeigten schon zu Beginn des Versuchs messbare Konzentrationen, die im Versuchsverlauf in beiden Gruppen relativ stabil waren. So lagen die gemessenen mittleren Werte der Cyp27b1^{+/+}-Tiere für IgA im gesamten Untersuchungszeitraum zwischen 541 µg/ml und 836 µg/ml und bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren zwischen 201 µg/ml und 442 µg/ml. Es ist außerdem zu erkennen, dass die Cyp27b1^{+/+}-Tiere im gesamten Versuchsverlauf tendenziell etwas höhere Gesamt-IgA-Titer aufwiesen als Cyp27b1^{-/-}-Tiere, dies erreichte jedoch zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz (Abb. 19c).

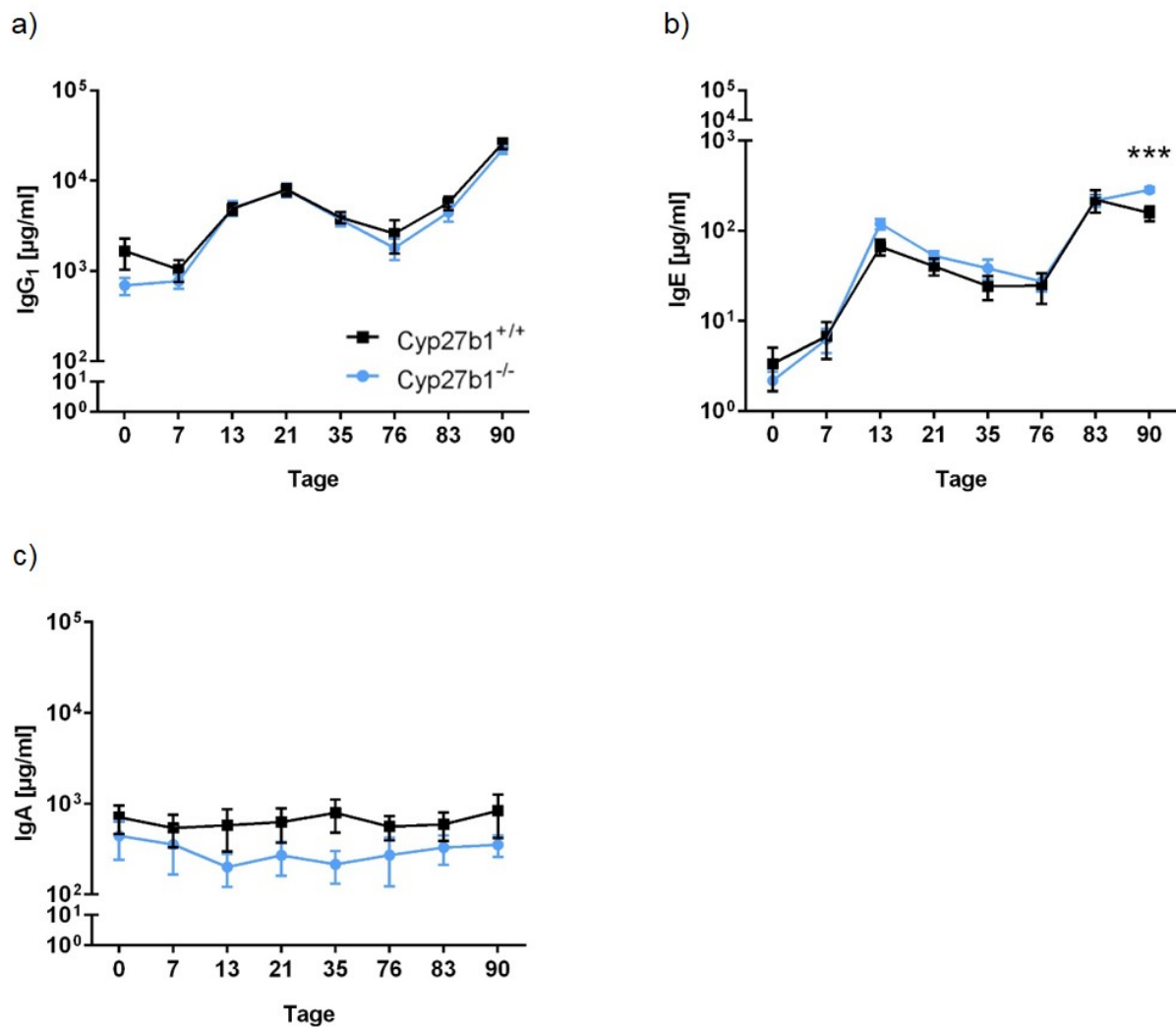


Abb. 19: Verlauf der humoralen Immunantwort bei *H.p. bakeri*-infizierten Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen.

Am Tag 0 des Versuchs wurden die Mäuse durch orale Gabe von je 200 L3-Larven mit *H.p. bakeri* infiziert und die Infektion am Tag 14 durch Gabe des Anthelminthikums Pyrantel pamoate abgebrochen. Eine zweite Infektion mit je 200 L3-Larven erfolgte am Tag 76. Das an den Tagen 0, 7, 13, 21, 35, 76, 83 und am Versuchsende am Tag 90 entnommene Blut wurden zur Messung der Konzentrationen von a) IgG₁, b) IgE und c) IgA mittels ELISA verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von 7-8 Tieren pro Gruppe ($p < 0,001$ ***).

6.5.2 Spezifisches Immunglobulinprofil nach Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Beide Genotypen, Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tiere, zeigten für *H.p. bakeri*-spezifisches IgG₁ eine verzögert einsetzende Antikörperfreisetzung. Dabei ist zu erkennen, dass die mittlere *H.p. bakeri*-IgG₁-Konzentration bei den Cyp27b1^{+/+}-Mäusen früher anstieg als dies bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren der Fall war. Nach der

Sekundärinfektion am Tag 76 war bei beiden Gruppen eine sehr starke Zunahme der *H.p. bakeri*-spezifischen IgG₁-Konzentration messbar. Diese war bei den Cyp27b1^{+/+}-Tieren am Tag 90 mit statistischer Signifikanz um 70 % gegenüber den Cyp27b1^{-/-}-Tieren erhöht. Die Steigerung der mittleren *H.p. bakeri*-IgG₁-Konzentration vom Tag 76 bis Tag 90 des Experiments erfolgte bei den Cyp27b1^{+/+}-Tieren um mehr als das 126.000-Fache und bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren um mehr als das 44.000-Fache (Abb. 20a).

Bereits 13 Tage nach der ersten Infektion mit dem Nematoden war bei beiden Genotypen ein starker Anstieg des *H.p.bakeri*-spezifischen IgE auf durchschnittlich 48 LU/ml bei den Cyp27b1^{+/+}-Tieren und 46 LU/ml bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren nachweisbar. Dieser verstärkte sich nach der erneuten Infektion am Tag 76 nochmals bis zum Ende des Versuchs, und zwar um das 21-Fache bei den Cyp27b1^{+/+}- und um das 31-Fache bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren. Sein Maximum erreichte das *H.p.bakeri*-spezifische IgE am Tag 90 mit einem bei den Cyp27b1^{-/-}-Tieren um 120 % signifikant erhöhten wurmspezifischen IgE-Wert gegenüber den Cyp27b1^{+/+}-Tieren ($p<0,0001$) (Abb. 20b).

Die *H.p. bakeri*-spezifischen IgA-Konzentrationen zeigten über den gesamten Versuchszeitraum große Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren beider Genotypen, so dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen ergaben (Abb. 20c).

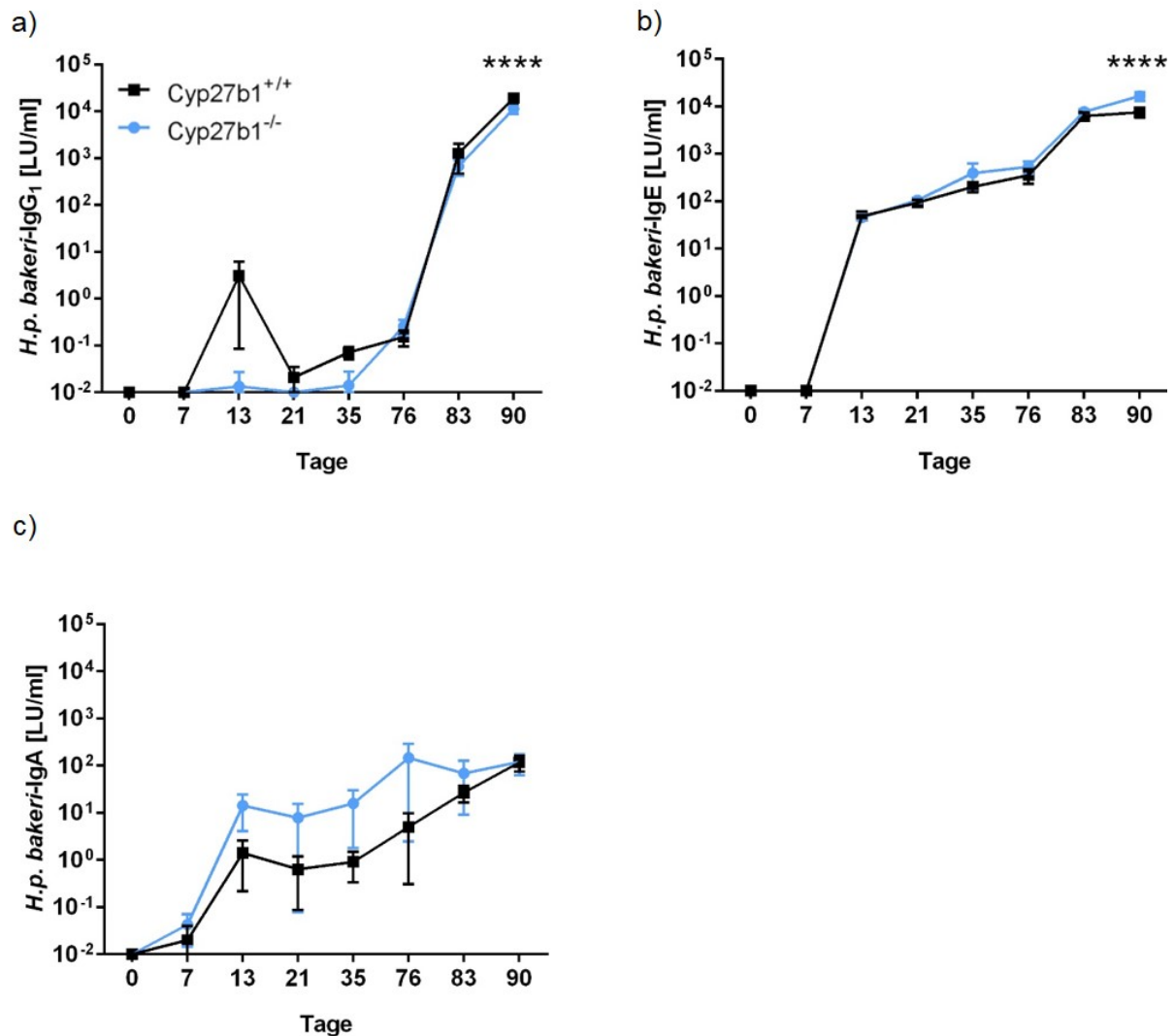


Abb. 20: Verlauf der spezifischen Immunglobulinantworten bei *H.p. bakeri*-infizierten Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäusen.

Am Tag 0 des Versuchs wurden die Mäuse durch orale Gabe von je 200 L3-Larven mit *H.p. bakeri* infiziert und die Infektion am Tag 14 durch Gabe des Anthelminthikums Pyrantel pamoate abgebrochen. Eine zweite Infektion mit je 200 L3-Larven erfolgte am Tag 76. Das an den Tagen 0, 7, 13, 21, 35, 76, 83 und am Versuchsende am Tag 90 entnommene Blut wurden zur Messung der *H.p. bakeri*-spezifischen Konzentrationen von a) IgG₁, b) IgE und c) IgA mittels ELISA verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von 7-8 Tieren pro Gruppe ($p < 0,0001$ ****).

6.5.3 Ausgang der Infektion mit dem Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri* bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-} -Mäusen

Um den Ausgang der *H.p. bakeri*-Infektion bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-} - und Cyp27b1^{+/+} -Wildtyp-Tieren näher zu untersuchen, wurden verschiedene parasitologische Parameter im Verlauf und am Ende des Versuchs bestimmt. Dabei war zwischen unterschiedlich behandelten Tieren zu differenzieren: Jeweils eine

Gruppe der Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Tiere erhielt am Tag 0 eine Primärinfektion mit dem Nematoden *H.p. bakeri*, die am Tag 14 medikamentös abgebrochen wurde, um diese Tiere am Tag 76 mit einer sekundären Infektion zu konfrontieren. Im Vergleich dazu wurden Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Tiere untersucht, die nur am Tag 76 eine primäre Infektion mit dem Parasiten erhielten (siehe Versuchsaufbau Abb. 6).

Zu den untersuchten parasitologischen Parametern gehörte u. a. die Anzahl der Nematodeneier pro Gramm Faeces der Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Tiere (EPG). Die Daten zeigen, dass 14 Tage nach einer Primärinfektion, d. h. an den Versuchstagen 14 bzw. 90 zahlreiche Eier in den Faeces nachweisbar waren. Deren Anzahl war bei Cyp27b1^{-/-} -Tieren um das 2,4-Fache am Tag 14 und um das 3,6-Fache am Tag 90 gegenüber den Cyp27b1^{+/+} -Tieren signifikant erhöht (Abb. 21a, b). Nach dem Abbruch des Wurmbefalls und einer sekundären Infektion waren bei keiner der beiden Gruppen, Cyp27b1^{+/+} - oder Cyp27b1^{-/-} -Tiere, Nematodeneier nachweisbar (Abb. 21a).

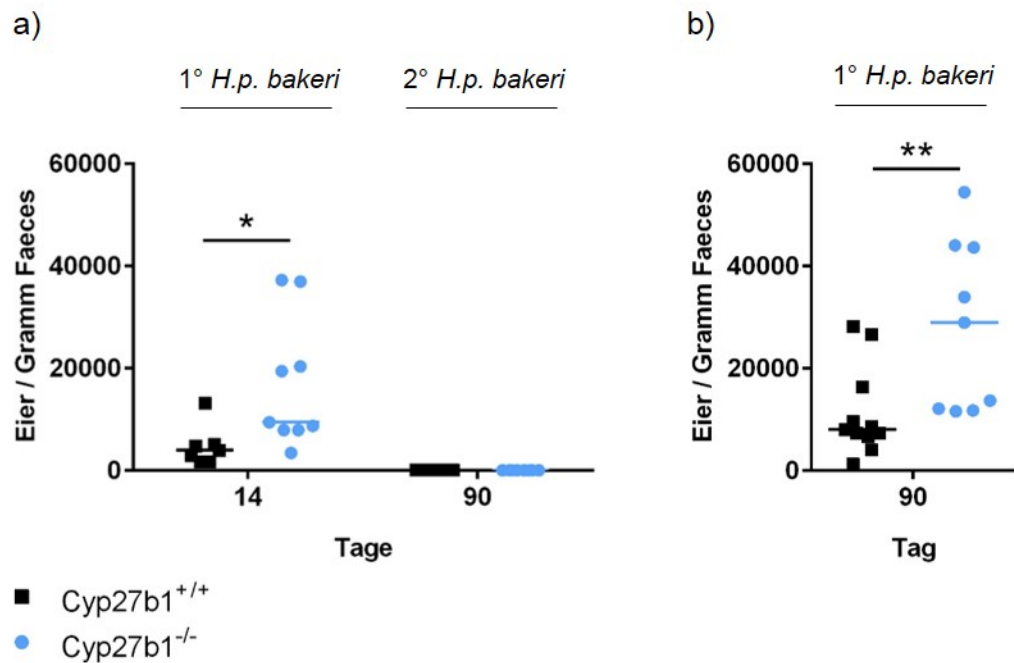


Abb. 21: Anzahl der Nematodeneier in den Faeces *H.p. bakeri*-infizierter Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäuse.

Am Tag 0 des Versuchs wurden die Mäuse durch orale Gabe von je 200 L3-Larven mit *H.p. bakeri* infiziert (Primärinfektion) und die Infektion am Tag 14 durch Gabe des Anthelminthikums Pyrantel pamoate abgebrochen. Eine sekundäre Infektion mit je 200 L3-Larven erfolgte am Tag 76, ebenso wie eine primäre Infektion naiver Tiere mit je 200 L3-Larven. Die Bestimmung der Anzahl der Nematodeneier in den Faeces (EPG) nach der Primärinfektion erfolgte an den Tagen 14 bzw. 90 (1° *H.p. bakeri*) und nach der Sekundärinfektion am Tag 90 (2° *H.p. bakeri*).

a) EPG der Tiere, welche eine Primärinfektion am Versuchstag 0 und eine Sekundärinfektion am Tag 76 erhielten (n=7-9)

b) EPG der Tiere, welche nur eine Primärinfektion am Versuchstag 76 erhielten (n=9-11)

Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **).

Die letztgenannten Ergebnisse der EPG hinsichtlich Abwesenheit von Nematodeneiern nach der sekundären Infektion, spiegeln sich in der Wurmlast, d. h. der Anzahl der Nematoden im Darm der infizierten Mäuse wider. Nach der Primärinfektion konnten bei einer Cyp27b1^{+/+}-Maus durchschnittlich 132 Nematoden und bei einer Cyp27b1^{-/-}-Maus durchschnittlich 140 Nematoden isoliert werden (Abb. 22b). Nach der Sekundärinfektion waren hingegen keine Würmer im Darm der infizierten Mäuse mehr nachweisbar (Abb. 22a). Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte war hinsichtlich der Wurmlast ein Unterschied zwischen Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Tieren erkennbar (Abb. 22).

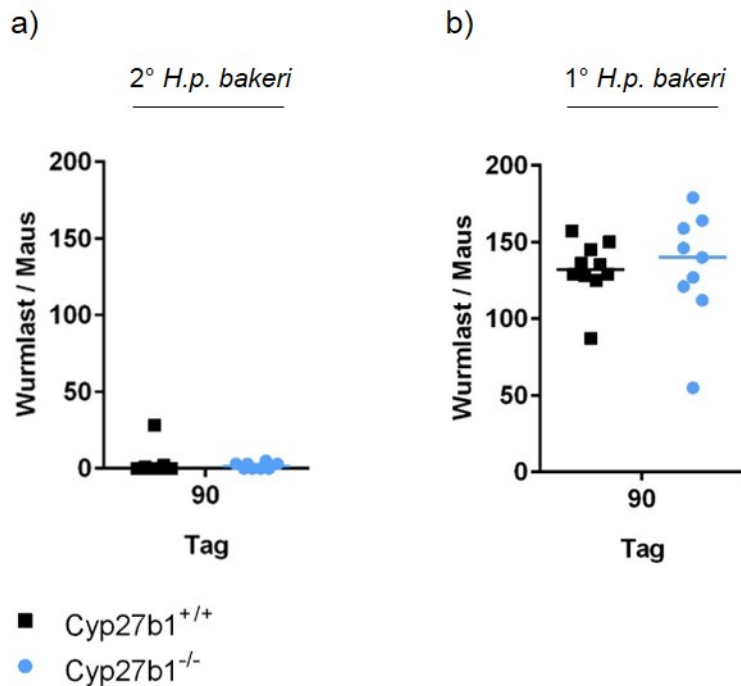


Abb. 22: Anzahl der Nematoden im Dünndarm *H.p. bakeri*-infizierter *Cyp27b1*^{+/+} - und *Cyp27b1*^{-/-}-Mäuse am Versuchstag 90.

Am Tag 0 des Versuchs wurden die Mäuse durch orale Gabe von je 200 L3-Larven mit *H.p. bakeri* infiziert (Primärinfektion) und die Infektion am Tag 14 durch Gabe des Anthelminthikums Pyrantel pamoate abgebrochen. Eine sekundäre Infektion mit je 200 L3-Larven erfolgte am Tag 76, ebenso wie eine primäre Infektion naiver Tiere mit je 200 L3-Larven.

a) Wurmlast der Tiere, welche eine Primärinfektion am Versuchstag 0 und eine Sekundärinfektion am Tag 76 erhielten (n=7-8).

b) Wurmlast der Tiere, die nur eine Primärinfektion am Versuchstag 76 erhielten (n=9-10)

Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median.

Einen weiteren untersuchten parasitologischen Parameter stellte die Fekundität der weiblichen Nematoden dar. Um zu untersuchen, ob die Fekundität der aus den Vitamin D-defizienten *Cyp27b1*^{-/-}-Mäusen isolierten Nematoden verändert war, wurden die weiblichen *H.p. bakeri* isoliert und hinsichtlich ihres Eiausstosses innerhalb von 24 h untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen *Cyp27b1*^{+/+} - und *Cyp27b1*^{-/-}-Tieren gefunden werden. Die Nematoden, die aus infizierten *Cyp27b1*^{+/+}-Tieren isoliert wurden, gaben im Untersuchungszeitraum durchschnittlich 80 Eier ab, während jene aus infizierten *Cyp27b1*^{-/-}-Tieren im gleichen Zeitraum durchschnittlich 88 Eier produzierten (Abb. 23).

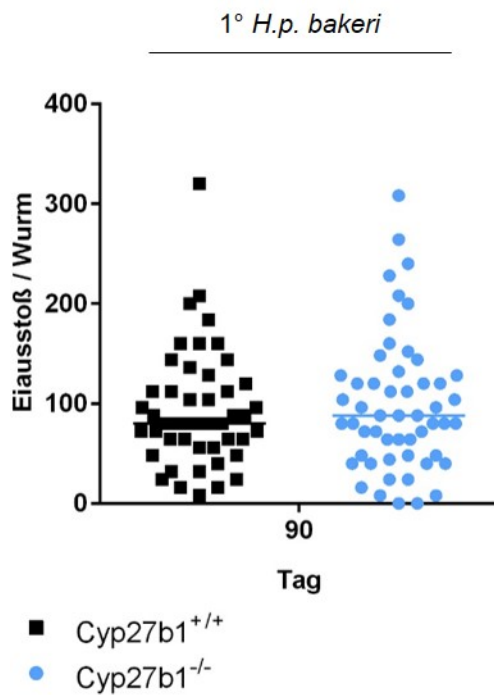


Abb. 23: Fekundität der weiblichen *H.p. bakeri* isoliert aus dem Dünndarm infizierter Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäuse.

Am Tag 0 des Versuchs wurden die Mäuse durch orale Gabe von je 200 L3-Larven mit *H.p. bakeri* infiziert (Primärinfektion) und die Infektion am Tag 14 durch Gabe des Anthelminthikums Pyrantel pamoate abgebrochen. Eine sekundäre Infektion mit je 200 L3-Larven erfolgte am Tag 76, ebenso wie eine primäre Infektion naiver Tiere mit je 200 L3-Larven. Am Ende des Versuchs am Tag 90 wurden die im Dünndarm der primär-infizierten Tiere befindlichen weiblichen *H.p. bakeri* (n=47-53) isoliert, für 24 h kultiviert und die Anzahl der in dieser Zeit produzierten Nematodeneier ermittelt.

Die horizontalen Balken der Scatterplots repräsentieren den Median.

7 Diskussion

7.1 Der Knockout des *Cyp27b1*-Gens bei Mäusen führt zu einer gesteigerten humoralen IgE-Immunantwort

Die Bedeutung von Vitamin D für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Allergien ist bisher nicht hinreichend geklärt. Es gibt sowohl Studien, die eine protektive Wirkung des Vitamins gegenüber einer Allergieentstehung zeigen als auch solche, die einen Zusammenhang zwischen Vitamin D-Supplementation und dem Auftreten von Allergien vermuten lassen^{135, 141-143}. Um die Bedeutung von Vitamin D bei der T-Zell-abhängigen Sensibilisierung genauer zu untersuchen, haben wir Vitamin D-defiziente *Cyp27b1*^{-/-}- und Wildtyp-*Cyp27b1*^{+/+}-Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund eingesetzt. Durch Untersuchungen von Herz et al. ist bekannt, dass Tiere mit einem BALB/c-Hintergrund, verglichen mit BL/6-Mäusen, mit höheren Titern der T_H2-typischen Immunglobuline IgG₁ und IgE auf Immunisierungen mit OVA reagieren¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Dies kann auf eine erhöhte Freisetzung von IL-4 bei den BALB/c-Tieren, im Vergleich zu BL/6-Tieren, zurückgeführt werden. Die Unterschiede in der IL-4-Produktion zwischen den Tieren verschiedener genetischer Hintergründe werden von den Autoren auf eine mögliche Verschiebung der T_H1/T_H2-Balance bei den BL/6-Tieren zurückgeführt, die somit im Gegensatz zu den phänotypisch T_H2-geprägten BALB/c-Tieren einen gemischten T_H1/T_H2-Phänotyp aufweisen würden¹⁷⁰. In unserem Modell zeigten jedoch auch BL/6-Mäuse eine starke humorale Immunantwort, welche sich in messbaren Immunglobulintitern widerspiegelte (Abb. 10 und Abb. 11)¹⁶⁹. Dies kann zum Teil in der Dauer unseres Experiments von 100 Tagen begründet liegen, da die Konzentrationen der gemessenen Immunglobuline im Versuchsverlauf anstiegen und so höhere Werte erreichten, als dies bei den Versuchen von Herz et al. der Fall war, deren Versuchsdauer bei ca. 30 Tagen lag¹⁶⁷. Neben dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere sind die Applikationsformen der Allergene sowie die Wahl des Adjuvants von großer Bedeutung. In der Literatur findet sich dazu die systemische Sensibilisierung durch z. B. intraperitoneale Injektion des Allergens in Verbindung mit dem Adjuvant Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) als bevorzugte Kombination zur Induktion einer T_H2-Immunantwort¹⁶⁸. Dies konnte durch eigene Untersuchungen in unserem Modell bestätigt werden, die durch einen deutlichen Anstieg der T_H2-assoziierten Immunglobuline IgG₁ und IgE gekennzeichnet waren (Abb. 10 und Abb. 11).

Die Ergebnisse aus den hier präsentierten Untersuchungen zur T-Zell-abhängigen Sensibilisierung von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren zeigen, dass Cyp27b1^{-/-}-Mäuse bereits vor Beginn der Sensibilisierung 5-fach erhöhte Gesamt-IgE-Werte im Vergleich zu Cyp27b1^{+/+}-Tieren aufwiesen (Abb. 10b). Dies bestätigen Daten von Wittke et al., die bei ebenfalls nicht-sensibilisierten VDR^{-/-}-Tieren erhöhte Gesamt-IgE-Werte beobachteten¹⁷¹. Die Steigerung der Gesamt-IgE-Werte bei Cyp27b1^{-/-}-Mäusen gegenüber denen der Wildtyp-Pendants blieb über den gesamten Versuchszeitraum bestehen. Dies wurde gleichfalls von Wittke et al. beschrieben, deren Untersuchungen jedoch keine weiteren Immunglobuline einschlossen¹⁷¹. Unsere Analysen hingegen umfassten auch die Messungen von IgG₁ und IgA. Die Gesamt-IgG₁-Werte nicht-sensibilisierter Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tiere waren zu Beginn des Versuchs vergleichbar. Im weiteren Versuchsverlauf zeigten die Cyp27b1^{-/-}-Tiere jedoch gegenüber ihren Wildtyp-Pendants stärkere Antworten von Gesamt-IgG₁ (Abb. 10a). Für den Klassenwechsel zu IgG₁, wie auch zu IgE, ist u. a. die Freisetzung von IL-4 durch T-Zellen notwendig¹⁷²⁻¹⁷⁴. Hier könnte ein Vitamin D-Mangel durch Erhöhung der IL-4-Produktion, wie von Staeva-Vieira et al. beschrieben¹⁷⁵, zu einem verstärkten Klassenwechsel hin zu IgG₁ bzw. IgE führen und so die erhöhten IgG₁- und IgE-Konzentration im Blutplasma Vitamin D-defizienter Cyp27b1^{-/-}-Tiere erklären.

Auch die Gesamt-IgA-Werte waren bei Cyp27b1^{-/-}-Mäusen gegenüber Cyp27b1^{+/+}-Tieren am Versuchsende erhöht (Abb. 10c). Die Expression von IgA benötigt u. a. das durch aktivierte T-Zellen sezernierte Zytokin IL-6¹⁷⁶⁻¹⁷⁸, dessen Freisetzung durch 1,25(OH)₂D₃ inhibiert werden kann¹⁷⁹. Die Erhöhung der Gesamt-IgA-Konzentration bei Cyp27b1^{-/-}-Mäusen verglichen mit Cyp27b1^{+/+}-Tieren könnte daher mit einer durch den Vitamin D-Mangel erhöhten IL-6-Produktion erklärt werden, welche zu einer Verstärkung des Isotypenklassenwechsels von IgM zu IgA führen könnte¹⁷⁷.

Die Verlaufskurven der OVA-spezifischen Immunglobuline IgG₁, IgE und IgA wiesen eine vergleichbare Entwicklung über den Versuchszeitraum von 100 Tagen auf (Abb. 11). Erwartungsgemäß waren vor Beginn der Sensibilisierung am Tag 0 in keinem der beiden Genotypen Allergen-spezifische Immunglobuline nachweisbar, während nach Abschluss der Sensibilisierungsphase am Tag 35 ein starker Anstieg der OVA-spezifischen Antikörper erkennbar war, wobei jedoch noch kein ausgeprägter Unterschied zwischen Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren gemessen

werden konnte. Dies war erst zum Ende des Versuchs hin möglich und zeigte eine Erhöhung des spezifischen IgG₁, IgE sowie IgA bei Cyp27b1^{-/-}- gegenüber Cyp27b1^{+/+}-Tieren (Abb. 11). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen unsere Gruppe, die bei Vitamin D-defizienten BALB/c-Tieren und -suffizienten Kontrollmäusen nach der Sensibilisierungsphase eine starke Induktion der OVA-spezifischen-IgG₁- und -IgE-Konzentrationen erkennen ließen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Vitamin D-defizienten Tieren und Kontrollmäusen konnte jedoch auch hier erst nach einer erneuten Gabe des Allergens (Boost) beobachtet werden¹⁸⁰. Der erst im späteren Verlauf der humoralen Immunantwort nach einem Boost erkennbare Unterschied zwischen Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}- und Cyp27b1^{+/+}-Tieren könnte auf neu-gebildete Plasmablasten zurückgeführt werden¹⁸⁰. Untersuchungen von Chen et al. zeigen, dass 1,25(OH)₂D₃ die Proliferation von B-Zellen *in vitro* inhibieren kann, welche für die Differenzierung zu Plasmablasten oder Plasmazellen benötigt wird^{127, 181}. Ebenso wurde gezeigt, dass bedingt durch die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ die Immunglobulinproduktion, besonders von IgG¹¹⁷ und IgE gehemmt wird^{128, 129}. Dieser fehlende inhibierende Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ stellt somit eine mögliche Erklärung für die bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren beobachteten erhöhten Immunglobulinspiegel dar.

T_H2-Immunantworten werden u. a. von Allergenen hervorgerufen und sind charakterisiert durch die Produktion von Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 sowie der Freisetzung der Immunglobuline IgE und IgG₁^{16, 18, 182, 183}. Die vorliegenden Ergebnisse der Analysen der beiden untersuchten Genotypen, Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tiere, hinsichtlich des Gesamt- und Allergen-spezifischen IgE und IgG₁, deuten auf eine für eine allergische Sensibilisierung charakteristische T_H2-Immunantwort hin. Diese war möglicherweise, verglichen mit den Cyp27b1^{+/+}-Pendants, bei den Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren stärker ausgeprägt und könnte so zu den beobachteten, teilweise signifikant erhöhten Immunglobulinspiegeln geführt haben. Wie bereits weiter oben ausgeführt, könnte zusätzlich dazu der inhibierende Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ auf die Freisetzung von IL-4 durch T-Zellen die beobachteten Effekte erklären¹⁷⁵. Als Konsequenz daraus könnte bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren eine größere Anzahl der in beiden Genotypen prozentual gleich häufig auftretenden B-Zellen (Anhang Tabelle III und V) den Isotypenklassenwechsel zu IgG₁ und/oder IgE vollzogen haben und somit

die verstärkte Freisetzung von Gesamt- und OVA-spezifischen Antikörpern bewirkt haben. Unsere Untersuchungen der Leukopoese bei Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren schloss auch geschwächte B-Zellen (CD19⁺ IgM⁻ IgD⁻) ein (Anhang Tab. III), jedoch handelte es sich bei den dabei untersuchten Tieren um unbehandelte Mäuse, deren B-Zellen keine für den Klassenwechsel notwendige Aktivierung durch Sensibilisierung oder Infektion erfahren haben¹⁸⁴. Um der Mutmaßung einer bei Cyp27b1^{-/-}-Tieren verstärkten T_H2-Immunantwort nachzugehen, wäre es in zukünftigen Versuchen sinnvoll, die T_H2-Antwort durch Messungen des Zytokinprofils, besonders IL-4, und der Quantifizierung von T_H2-Zellen zu verifizieren und zu ermitteln, ob der beobachtete Effekt tatsächlich aufgrund einer verstärkten T_H2-Immunantwort bei den Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren entstanden ist. Dem widersprechend ist aus der Literatur bekannt, dass 1,25(OH)₂D₃-behandelte T-Zellen verstärkt T_H2-Immunantworten ausbilden können^{116, 117, 123} und die Freisetzung von IL-4 durch die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ erhöht wird¹⁸⁵. Demzufolge wäre in unserem Versuchsaufbau bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren ein gegenteiliger Effekt, d.h. eine abgeschwächte T_H2-Antwort zu erwarten gewesen¹²³. Daten von Froicu et al. mit VDR^{-/-}-Tieren zeigen, dass diese eine mit Wildtyp-Tieren vergleichbare oder verringerte T_H2-Antwort aufweisen, während die IgE-Produktion erhöht ist¹⁸⁶. Hinweise für eine vergleichbare Situation bei unseren Cyp27b1^{-/-}-Tieren ergaben sich im Rahmen der *H.p. bakeri*-Infektion bei Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren. Messungen des Zytokins IL-13 in Vorversuchen zeigten dort einen signifikant geringeren Anstieg bei Cyp27b1^{-/-}-Tieren verglichen mit Cyp27b1^{+/+}-Mäusen, was auf eine durch die Vitamin D-Defizienz abgeschwächte T_H2-Immunantwort hindeuten könnte (Daten nicht gezeigt).

Interessant wäre außerdem die Quantifizierung regulatorischer T-Zellen sowie die Messung von IL-10 bei Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren, die bei den Vitamin D-defizienten Tieren niedriger ausfallen müsste, da bekannt ist, dass Calcitriol die Differenzierung Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen^{124, 125} und IL-10 produzierender Typ 1-regulatorischer T-Zellen^{116, 117} fördert, ebenso wie die IL-10-Produktion durch aktivierte B-Zellen¹⁸⁷. Des Weiteren ist bekannt, dass durch B-Zellen sezerniertes IL-10 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Autoimmunkrankheiten zukommt¹⁸⁸, es also auch bei Entstehung und Aufrechterhaltung von Allergien bedeutsam sein könnte. In unsere Analyse der Leukopoese bei Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen haben wir ebenfalls regulatorische T-Zellen (CD4⁺ CD25⁺) eingeschlossen. Hier

zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Genotypen. Wie bereits weiter oben erläutert, fehlte auch hier die zur Expansion der Zellen benötigte Stimulation durch ein Antigen¹⁸⁹. Untersuchungen OVA-spezifischer regulatorischer T-Zellen in Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen nach Sensibilisierung wären interessant aber aufgrund der geringen Anzahl der antigenspezifischen regulatorischen T-Zellen schwer durchführbar¹⁹⁰. Einen Hinweis, dass Calcitriol auch in unserem Modell zu einer erhöhten Freisetzung von IL-10 führt und Vitamin D-defiziente Cyp27b1^{-/-}-Tiere demzufolge tatsächlich weniger IL-10 produzieren, ergaben Messungen in Vorversuchen mit *H.p. bakeri*-infizierten Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen, die zeigten, dass Cyp27b1^{-/-}-Mäuse verglichen mit Cyp27b1^{+/+}-Tieren eine tendenziell geringere IL-10-Produktion aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Vitamin D-Defizienz der Cyp27b1^{-/-}-Mäuse betrifft jede Zelle des Organismus. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Auswirkungen dessen zahlreiche weitere als die bereits weiter oben ausgeführten und diskutierten einzelnen Zelltypen, Zytokine und Signalwege betrifft. Synergistisch könnten diese zu den einzelnen beobachteten Effekten führen. Möglich und wahrscheinlich erscheint jedoch eine allgemein übersteigerte Immunreaktion mit weit mehr, jedoch bisher nicht dokumentierten Auswirkungen, zu dessen Folgen unter vielen anderen eine verstärkte humorale Immunantwort zählt, die sich auch im Vorhandensein autoreaktiver Antikörper widerspiegelt.

7.2 Der Knockout des *Cyp27b1*-Gens bei Mäusen beeinflusst die Leukopoese im Knochenmark und begünstigt das Auftreten autoreaktiver Antikörper gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene

In der vorliegenden Arbeit wurde mit *Cyp27b1*^{-/-}-Mäusen gearbeitet. Diese sind bedingt durch eine fehlende Expression des Enzyms 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) defizient für 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol)¹⁴⁵. Durch diesen Mangel hervorgerufene mögliche Stoffwechselstörungen sollten durch die Anreicherung der Nahrung mit 2 % Calcium, 1,25 % Phosphor und 20 % Laktose vermieden werden¹⁴⁸.

Das tatsächliche Vorliegen einer Vitamin D-Defizienz des *Cyp27b1*^{-/-}-Genotyps wurde entsprechend der Literatur¹⁴⁵ durch unsere Messungen von 25-Hydroxyvitamin D₃ sowie 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Blutplasma von *Cyp27b1*^{+/+}- und *Cyp27b1*^{-/-}-Tieren bestätigt (Abb. 15a, b).

Dardenne et al. beschreiben die Körpermasse der *Cyp27b1*^{-/-}-Mäuse, verglichen mit *Cyp27b1*^{+/+}-Tieren, als „letztendlich“ normal¹⁴⁸. Unsere Messungen bei 9-13 Wochen alten Tieren ergaben eine zunächst geringere Körpermasse der *Cyp27b1*^{-/-}-Tiere, von maximal 2 g unter jener der Wildtyp-Pendants (Abb. 16), die sich unseren Beobachtungen zufolge jedoch mit steigendem Alter der Körpermasse der *Cyp27b1*^{+/+}-Tiere angleicht und somit die Ergebnisse von Dardenne et al. bestätigen. Die von uns festgestellte geringere Körpermasse der *Cyp27b1*^{-/-}-Tiere könnte auf deren vermindertes Knochenwachstum, gemessen an einer geringeren Größe des Femurs, zurückgeführt werden, welches trotz der mit Calcium-angereicherten Nahrung beschrieben wird¹⁴⁸. Diese Beobachtungen in Vitamin D-defizienten *Cyp27b1*^{-/-}-Tieren könnten dadurch verursacht werden, dass bei der Differenzierung von Chondrozyten der Epiphysenfuge Calcitriol selbst eine entscheidende Rolle spielt, dessen nicht-genomische Effekte auf die Proteinkinase C über die Aktivierung der Phospholipase C vermittelt werden¹⁹¹.

Eine weitere mögliche Erklärung für das verzögerte Angleichen der Körpermasse junger *Cyp27b1*^{-/-}-Tiere an jene der *Cyp27b1*^{+/+}-Tiere könnte die verspätet einsetzende Versorgung der Tiere mit Calcium-angereicherter Nahrung sein. Diese sollte sofort nach dem Absetzen der *Cyp27b1*^{-/-}-Jungtiere verabreicht werden, was zum Teil durch notwendige Genotypisierungen und Transporte der Tiere verzögert wurde. In der Literatur ist dazu beschrieben, dass sich dadurch auftretende

Störungen wie beispielsweise Hypokalzämie durch die Gabe Calcium-angereicherter Nahrung innerhalb von zwei Wochen normalisieren¹⁴⁸.

Nach unserer Erkenntnis gibt es bis heute keine ausführlichen Untersuchungen bezüglich des Auftretens und der Verteilung einzelner Subpopulationen der Zellen des Immunsystems bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Mäusen. Unsere Analysen der Gesamtzellzahlen von Knochenmark, Thymus, Milz und Peritoneum von Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren ergab für den Cyp27b1^{-/-}-Genotyp im Vergleich zu Cyp27b1^{+/+}-Mäusen verringerte Zellzahlen von bis zu 80 % in allen untersuchten lymphatischen Geweben (Abb. 17). Trotzdem zeigten sich bei verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen in den untersuchten Organen hinsichtlich ihres Auftretens und ihrer prozentualen Anteile an den Gesamtzellzahlen keine wesentlichen Unterschiede zwischen Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Mäusen (Anhang Tab. III-VI). Eine mögliche Erklärung für die gefundenen geringeren Gesamtzellzahlen bei Cyp27b1^{-/-}-Tieren könnte daher die ebenfalls von uns festgestellte geringere Körpermasse (Abb. 16) und die geringeren Organgrößen der Cyp27b1^{-/-}-Mäuse verglichen mit Cyp27b1^{+/+}-Tieren sein.

Unsere Untersuchungen verschiedener Zellpopulationen des Immunsystems umfassten Subpopulationen der B-Zellentwicklung, B1- und B2-Zellen, T-Zellen sowie myeloide Zellen. Die Daten zeigen, dass bei den Cyp27b1^{-/-}-Mäusen alle untersuchten Subpopulationen vorhanden waren und durch den Vitamin D-Mangel keine wesentlichen Störungen der Entwicklung dieser Zellen des Immunsystems auftraten (Anhang Tab. III-VI). Einzig im Knochenmark zeigten sich starke Unterschiede zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich der Zellzahlen einzelner Populationen, wobei die Cyp27b1^{-/-}-Tiere stets geringere prozentuale Anteile als ihre Wildtyp-Pendants aufwiesen (Abb. 18). Mathieu et al. beschreiben bei VDR^{-/-}-Tieren eine gestörte T-Zellentwicklung nach der Stimulation mit anti-CD3. Diese wird von den Autoren darauf zurückgeführt, dass die calciumabhängige Stimulation bei den hypokalzämischen VDR^{-/-}-Tieren, bei normaler Diät ohne zusätzliches Calcium gestört ist¹⁵¹. Panda et al. fanden bei ihren Cyp27b1^{-/-}-Tieren neben einer verringerten Ca²⁺-Konzentration im Blutserum auch eine geringere Anzahl CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut¹⁵⁰. Diese Befunde könnten ebenfalls durch eine verminderte Ca²⁺-Konzentration erklärt werden, da deren Cyp27b1^{-/-}-Tiere keine Calcium-angereicherte Nahrung erhielten¹⁵⁰.

Durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration z. B. durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum oder den Einstrom aus dem extrazellulären Raum wird die Translokation des *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) in den Nukleus und damit die Expression von u. a. IL-2 bewirkt. Somit stellt Calcium einen essentiellen Faktor für die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen dar^{7, 192} und liefert eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte in hypokalzämischen VDR^{-/-}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren. Mittels der Gabe einer mit Calcium und Laktose angereicherten Diät, wie sie auch unsere Cyp27b1^{-/-}-Tiere erhalten haben, konnten die von Mathieu et al. beschriebenen Effekte bei den VDR^{-/-}-Tieren korrigiert werden^{92, 151}. Für nachfolgende Analysen der Entwicklung des Immunsystems bei Cyp27b1^{-/-}-Tieren wäre es demnach notwendig, die Konzentration von Ca²⁺ im Blut der Tiere zu bestimmen. Hinsichtlich der gefundenen erniedrigten Zellzahlen einzelner Subpopulationen im Knochenmark unserer Cyp27b1^{-/-}-Tiere, die hauptsächlich Stadien der B-Zellentwicklung betrafen, kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese, trotz angereicherter Nahrung, auf einen Calciummangel zurückzuführen sind. Studien von Habib et al. unterstreichen diese Möglichkeit, da hier beschrieben wird, dass eine normale Ca²⁺-Signalwirkung für die Reifung und Proliferation von B-Zellen benötigt wird¹⁹³. Dabei führt die Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor (BCR) zur Aktivierung verschiedener Tyrosinkinasen, wozu u. a. die Bruton's-Tyrosinkinase (BTK) gehört. Diese aktivieren die Phospholipase C, welche daraufhin die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) katalysiert. Die Bindung von IP₃ an seinen Rezeptor führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum, was letztendlich die Expression bzw. Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie Myc oder den *nuclear factor of activated B cells* (NF-κB) bewirkt¹⁹³⁻¹⁹⁵. Für Myc zeigen Habib et al. eine essentielle Funktion in der B-Zellentwicklung¹⁹³. Der Transkriptionsfaktor NF-κB wiederum führt zur Expression von Proteinen wie beispielsweise *B cell lymphoma 6* (BCL-6), das u. a. eine wichtige Rolle bei der B-Zelldifferenzierung spielt^{195, 196}. Die Beteiligung von Ca²⁺ an diesen Prozessen erfordert die Aufrechterhaltung einer konstanten Calciumkonzentration im Blutserum, was u. a. durch die Mobilisierung von Ca²⁺ aus den Knochen ermöglicht wird, da diese 99 % des körpereigenen Calciumvorrats speichern¹⁹⁷.

Die gestörte Entwicklung einiger B-Zell-Subpopulationen im Knochenmark von Cyp27b1^{-/-}-Tieren könnte überdies durch die Bedeutung von Vitamin D innerhalb des Knochenstoffwechsels hervorgerufen worden sein. Dort führt Calcitriol zusammen mit Parathormon, welches aus der Nebenschilddrüse freigesetzt wird, bei Osteoblasten zur Expression von RANKL. Die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK auf Osteoklasten-Vorläuferzellen induziert deren Differenzierung und Reifung zu Osteoklasten, die für den Abbau von Knochen verantwortlich sind, was letztendlich zu einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration führt^{64, 100, 101}. Durch die bei Vorliegen einer Vitamin D-Defizienz mögliche fehlende oder verminderte Expression von RANKL differenzieren weniger Osteoklasten-Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten, was zur Anhäufung von Knochengewebe (Osteopetrose) führt¹⁹⁸. Von Osteopetrose betroffene Knochen zeigen einen Mangel an Knochenmark-enthaltenden Hohlräumen, die den Ort der B-Zellentwicklung darstellen¹⁹⁹. Durch ein so verändertes Umfeld beeinflusst und möglicherweise verstärkt durch einen Calciummangel, ließen sich die von uns beobachteten Defekte der B-Zellentwicklung erklären. Für zukünftige weiterführende Untersuchungen zur Entwicklung des Immunsystems bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren wäre es des Weiteren notwendig, eine größere Anzahl von Tieren einzusetzen, da insbesondere innerhalb der Gruppe der Cyp27b1^{-/-}-Mäuse zum Teil große Schwankungen zu beobachten waren (Abb. 18).

Unsere Daten zum Auftreten autoreaktiver Antikörper im Blutplasma von Mäusen mit unterschiedlichem 25-Hydroxyvitamin D₃-Status (Abb. 14) bestätigten unsere Vermutung, dass der Vitamin D₃-Mangel der Cyp27b1^{+/+} - bzw. Cyp27b1^{-/-}-Mäuse mit dem Auftreten von Autoantikörpern einhergeht. (Abb. 12). Entgegen unseren Erwartungen konnten jedoch in der Gruppe der Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einer regulären Vitamin D₃-Zufuhr von 1 kU/kg Futter bei allen fünf untersuchten Tieren Autoantikörper nachgewiesen werden. Um dies genauer zu analysieren wurde das Blutplasma aller untersuchten Tiere vom Zeitpunkt des Hep2-Tests hinsichtlich der Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₃ untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Median der 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentrationen der Cyp27b1^{+/+}-Mäuse mit einem regulären Gehalt von Vitamin D₃ (1 kU/kg Futter) mit 24,8 ng/ml sehr niedrig war und die Tiere dieser Gruppe somit Vitamin D-defizient waren (Abb. 14). Dies liefert eine Erklärung für das unerwartete Auftreten von Autoantikörpern in dieser Gruppe. Eine Ursache des niedrigen 25-Hydroxyvitamin D₃-Spiegels im Blutplasma dieser Tiere

könnte die Instabilität von Vitamin D gegenüber direktem Licht sein²⁰⁰. Daher ist es möglich, dass der Vitamin D-Gehalt des Futters durch die Wirkung von direktem Licht bereits vor dem Verfüttern erniedrigt war. Ebenfalls führt eine längere Lagerung des Futters zu einer Vitamin D-Instabilität und könnte somit eine weitere Ursache für die erniedrigten 25-Hydroxyvitamin D₃-Werte der Tiere sein²⁰¹.

Mögliche Mechanismen, wie ein Vitamin D-Mangel zur Produktion von Autoantikörpern bzw. zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen kann, sind in der Literatur zahlreich zu finden. Untersuchungen zum Einfluss von Calcitriol auf die Entwicklung von T_H1-, T_H9- und T_H17-Zellen und Daten zu deren Aktivität als pathogenetische Faktoren vieler Autoimmunerkrankungen lassen vermuten, dass eine Vitamin D-Defizienz das Auftreten dieser Erkrankungen aufgrund einer gesteigerten Entwicklung von T_H9- und T_H17-Zellen begünstigt²⁰². Dies geschieht möglicherweise z.B. mittels der bei Vitamin D-Mangel fehlenden suppressiven Wirkung von IL-10 auf T_H9-Zellen. Die Förderung von T_H17-Zellen hingegen ist infolge der fehlenden VDR-vermittelten Unterdrückung des *lineage*-spezifischen Transkriptionsfaktors *retinoic acid receptor-related orphan receptor γt* (ROR-γt) denkbar^{202, 203}. Eine verstärkte Expression von ROR-γt kann über die Aktivierung des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) durch das proinflammatorische Zytokin IL-6 vermittelt werden^{204, 205}. Dieser Effekt könnte durch einen Vitamin D-Mangel verstärkt werden, da u. a. Studien von Daniel et al. zeigen, dass 1,25(OH)₂D₃ in einem murinen Colitis-Modell zu einer Reduzierung der IL-6-Produktion führt¹⁷⁹.

Auch die fördernde Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ auf regulatorische T-Zellen (Treg)^{124, 125, 206} kann zur Erklärung für das Entstehen von Autoantikörpern bei Vitamin D-Mangel herangezogen werden. Als Bestätigung dafür wurde von mehreren Gruppen ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen und Defekten des Treg-Kompartments gezeigt^{207, 208}.

Einen weiteren Ansatz, wie ein Vitamin D-Mangel die Entstehung von Autoantikörpern fördern kann, stellt die hemmende Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ auf die Proliferation und Plasmazell-Differenzierung von B-Zellen sowie die Immunglobulinfreisetzung dar¹²⁷⁻¹²⁹. Studien von Linker-Israeli et al. zeigen außerdem, dass *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE), die in Anwesenheit von 1,25(OH)₂D₃

kultiviert wurden, im Vergleich zu unbehandelten PBMCs eine verminderte Freisetzung von polyklonalem sowie dsDNA-spezifischem IgG zeigen²⁰⁹.

7.3 Der Knockout des *Cyp27b1*-Gens bei Mäusen führt zu einer erhöhten IgE-Produktion, die jedoch keinen Einfluss auf die Abwehr des Nematoden *Heligmosomoides polygyrus bakeri* hat

Der parasitäre Helminth *Heligmosomoides polygyrus bakeri* tritt in der wild-lebenden Mauspopulation natürlich auf (Abb. 2). Er hat sich stark an das murine Immunsystem angepasst und ruft chronische Infektionen hervor^{28, 29}. Infektionen mit Helminthen zeichnen sich durch die Induktion einer starken T_H2-Immunantwort aus, die durch eine erhöhte Zahl von CD4⁺ T-Zellen charakterisiert ist, die Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. Das wesentliche Merkmal ist jedoch ein starker Anstieg des Immunglobulins E im Blut Helminthen-infizierter Organismen²¹⁰.

In dem von uns durchgeführten Experiment wurden *Cyp27b1*^{+/+}-Wildtyp-Mäuse und Vitamin D-defiziente *Cyp27b1*^{-/-}-Tiere mit dem Nematoden *H.p. bakeri* infiziert und die humorale Immunantwort untersucht (Abb. 19 und Abb. 20).

In der Literatur ist zu finden, dass eine chronische Infektion von Mäusen mit adulten *H.p. bakeri* durch die bei einer primären Infektion mit den Helminthen hervorgerufene T_H2-Immunantwort, nicht verhindert werden kann²⁸. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung der Anzahl der Wurmeier in den Faeces (Abb. 21) sowie der Wurmlast der infizierten Tiere (Abb. 22b) bestätigt, welche eine andauernde Infektion mit den Parasiten zeigen. Ebenso und in Übereinstimmung mit der Literatur zeigen die eigenen Daten, dass infizierte Tiere durch das Verabreichen des Anthelminthikums Pyrantel pamoate von den Parasiten befreit werden können. Anschließend sollen die Tiere laut u. a. Reynolds et al. eine sehr effektive Gedächtnis-Immunantwort zeigen, die bei erneuter Infektion mit dem Nematoden eine erfolgreiche Abwehr ermöglicht^{29, 39, 40}. Dementsprechend konnten in unseren Versuchen 14 Tage nach der sekundären Infektion mit *H.p. bakeri* keine ausgeschiedenen Eier mehr nachgewiesen werden (Abb. 21a) und auch im Darm der Mäuse waren keine Parasiten mehr vorhanden (Abb. 22a).

Bei einem Vergleich der Anzahl der Nematodeneier in den Faeces von *Cyp27b1*^{+/+}-Wildtyp-Mäusen und Vitamin D-defizienten *Cyp27b1*^{-/-}-Tieren vor der Behandlung mit dem Anthelminthikum, zeigten die *Cyp27b1*^{-/-}-Tiere 14 Tage nach der Primärinfektion eine signifikant höhere Anzahl der Nematodeneier, gemessen pro Gramm Faeces (Abb. 21). Da diese Tiere jedoch ein anderes, mit Calcium, Phosphor und Laktose angereichertes, Futter als ihre *Cyp27b1*^{+/+}-Pendants erhielten, ist wahrscheinlich ein

geringeres Gewicht, verursacht durch einen möglicherweise geringeren Wassergehalt der Cyp27b1^{-/-}-Faeces, die Ursache für die ermittelten Unterschiede zwischen den Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren. Die Hypothese, dass die ermittelte Ungleichheit zwischen den Genotypen durch ein unterschiedliches Gewicht der Faeces verursacht wurde, wird durch die Ergebnisse bezüglich der Anzahl der Nematoden im Darm der Mäuse und der Fekundität der Parasiten unterstützt. Wäre der Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der Anzahl der Nematodeneier echt und z. B. auf eine stärkere Abwehr der Parasiten bei den Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp-Tieren zurückzuführen, sollte sich dieser Unterschied gleichermaßen in der Anzahl der Nematoden im Darm der Mäuse und bzw. oder der Fekundität der Parasiten bemerkbar machen. Die verbesserte Abwehr der Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp-Tiere würde in diesem Fall eventuell zu einer geringeren Besiedlung des Darms durch die Helminthen oder einer negativen Beeinflussung der Fruchtbarkeit der Nematoden führen. Da aber weder die Anzahl der Parasiten im Darm der infizierten Mäuse (Abb. 22b), noch die Fekundität der weiblichen Parasiten (Abb. 23) einen Unterschied zwischen Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren aufzeigen, ist davon auszugehen, dass der ermittelte Unterschied in der Anzahl der Nematodeneier zwischen den Genotypen auf ein unterschiedliches Gewicht der Faeces zurückzuführen ist. Dies könnte durch einen unterschiedlichen Wassergehalt erklärt werden, welcher durch die Nahrung selbst verursacht wurde oder auf ein eventuell verändertes, schwächeres Trinkverhalten der Cyp27b1^{-/-}-Tiere zurückgeführt werden. Aus der Literatur ist aufgrund der Untersuchungen von Kong et al. bekannt, dass VDR^{-/-}-Mäuse eine normale Nierenfunktion aufweisen, dabei aber ein gesteigertes Trinkverhalten und Polyurie zeigen. Dafür verantwortlich sei laut den Autoren die durch die Inaktivierung des VDR bedingte Heraufregulation von Renin in den Nieren und dem zentralen Nervensystem der Tiere²¹¹. Diese Feststellung einer normalen Nierenfunktion der Mäuse legt nahe, dass die Nahrung selbst die Ursache für das geringere Gewicht der Cyp27b1^{-/-}-Faeces ist. Somit wäre es für nachfolgende Versuche sinnvoll, beiden Genotypen ein Futter zu verabreichen, welches in der Grundzusammensetzung identisch ist und sich nur in dem Gehalt von Vitamin D unterscheidet.

Das Vorliegen einer für *H.p. bakeri*-Infektionen charakteristischen T_H2-Immunantwort²⁸ zeigen Daten aus Vorversuchen, in denen Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tiere einer primären Infektion mit *H.p. bakeri* unterzogen wurden. Im

Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigten infizierte Tiere beider Genotypen einen signifikanten Anstieg des zur T_H2 - Zelldifferenzierung beitragenden Transkriptionsfaktors *GATA-binding protein 3* (GATA3)^{212, 213} bei $CD4^+$ -Lymphozyten sowie der Zytokine IL-10 und IL-13 (Daten nicht gezeigt). Dabei war sowohl GATA3 als auch das Zytokin IL-10 bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren tendenziell in geringeren Mengen nachweisbar als bei Wildtyp-Tieren. Das Zytokin IL-13 wurde bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp-Tieren sogar signifikant weniger sezerniert. Somit stimmen unsere Daten mit Ergebnissen von Studien überein, die eine T_H2 -Immunantworten-fördernde Wirkung von Calcitriol beschreiben^{116, 117, 123}. Diese ergibt sich möglicherweise durch die von Sloka et al. beobachtete Verstärkung des STAT6-Signalweges durch 1,25(OH)₂D₃, die zu einer Heraufregulation der Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 führt²¹⁴. GATA3 wiederum vermittelt den Zugang weiterer Transkriptionsfaktoren zu den Genloci der Zytokine *IL-4*, *IL-5* und *IL-13*²¹², welche somit ebenfalls vermehrt exprimiert werden. Die Expression von IL-10 wird laut der Literatur ebenfalls durch die immunmodulatorische Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ verstärkt¹¹⁷. Heine et al. haben gezeigt, dass dies in aktivierten B-Zellen direkt durch Binden des VDR an den *IL-10*-Promotor und indirekt durch die Regulation des Calcium-Einstroms über den Ca²⁺-Kanal TRPV6 geschieht¹⁸⁷.

Sowohl für die Entwicklung der primären- als auch für die der Gedächtnis- T_H2 -Antwort bei *H.p. bakeri*-infizierten Mäusen sind B-Zellen von großer Bedeutung. Die von ihnen freigesetzten Antikörper³⁹ inhibieren sowohl das Wachstum der Larven als auch deren Migration⁴³. Dies führt zu einer verringerten Wurmlast der infizierten Mäuse, einer geringeren Anzahl an Wurmeiern in den Faeces der Wirtstiere sowie einer verminderten Fekundität der weiblichen Nematoden⁴⁴. Das dafür funktionell entscheidende Immunglobulin ist Studien zufolge IgG₁^{24, 45}, obwohl zusätzlich auch große Mengen IgE freigesetzt werden²⁴. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten sowohl das Gesamt- als auch das *H.p. bakeri*-spezifische IgG₁ einen starken Anstieg, besonders nach der sekundären Infektion am Tag 76 (Abb. 19a und Abb. 20a). Einen Unterschied zwischen Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren war besonders am Tag 90 der spezifischen IgG₁-Immunantwort bei Cyp27b1^{+/+}-Tieren zu beobachten, die eine hochsignifikant stärkere Freisetzung von spezifischen IgG₁ gegenüber den Cyp27b1^{-/-}-Tieren zeigten (Abb. 20a). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen von Chen et al. und Lemire et al. die zeigen, dass

Calcitriol bei B-Zellen bzw. bei humanen peripheren Zellen des Blutes *in vitro* die Produktion von IgG hemmt^{127, 215}, demzufolge also ein erhöhter IgG₁-Titer bei Cyp27b1^{-/-}-Tieren zu erwarten gewesen wäre. Allerdings handelt es sich bei den Untersuchungen der genannten Autoren um *in vitro*-Studien, die nicht die komplexe Dynamik innerhalb eines Organismus widerspiegeln können. Es wäre zu erwarten, dass die starke Erhöhung von spezifischem IgG₁, dem Immunglobulin welches entscheidend für die Abstoßung von *H.p. bakeri* ist⁴⁵, eine effektivere Abwehr des Parasiten bei den Wildtyp-Tieren ermöglicht, was wir jedoch nicht nachweisen konnten (Abb. 22, Abb. 23). Jedoch zeigte sich die bei Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp-Tieren gegenüber Cyp27b1^{-/-}-Tieren stark vermehrte Freisetzung von spezifischem IgG₁ erstmals am Ende des Versuchs am Tag 90. Es wäre interessant gewesen, den Verlauf der Immunantwort über den Tag 90 hinaus weiter verfolgen zu können, um so einen eventuell später auftretenden Vorteil der Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp-Tiere bei der Abwehr der Parasiten entdecken zu können.

Wie zuvor bereits bei den OVA-sensibilisierten Tieren beobachtet, zeigten Cyp27b1^{-/-}-Tiere gegenüber Cyp27b1^{+/+}-Mäusen während der Parasiteninfektion signifikant erhöhte Gesamt- und *H.p. bakeri*-spezifische IgE-Werte (Abb. 19b und Abb. 20b). Dies scheint jedoch auch in unserem Modell, wie bereits von anderen²⁴ gezeigt, keinen Einfluss auf die Abwehr der Parasiten zu haben (Abb. 22, Abb. 23). Der Klassenwechsel zu IgE wird, ähnlich wie der zu IgG₁, durch das Zytokin IL-4 reguliert¹⁷⁴. Dennoch sind im Verlauf der Infektion mit *H.p. bakeri* Unterschiede von Gesamt- sowie spezifischem IgE und -IgG₁ in Abhängigkeit des Vitamin D-Status zu erkennen (Abb. 19 und Abb. 20). Eine mögliche Erklärung dafür stellt die unterschiedliche Regulation der beiden Immunglobulin-Isotypen durch IL-4 dar. Studien von Siebenkotten et al. zeigen eine Abhängigkeit des Klassenwechsels zu IgG₁ und IgE von der Menge des vorhandenen IL-4. Demnach würde eine geringe Menge von IL-4 den Klassenwechsel zu IgG₁ induzieren, während für den Wechsel zu IgE eine 5-fach höhere Menge des Zytokins notwendig wäre¹⁷⁴. Die Bedeutung von Vitamin D für die Freisetzung von IL-4 ist bis heute unklar. Einerseits gibt es Studien die zeigen, dass Calcitriol die Produktion von IL-4 durch T_H2-Zellen verstärkt¹⁸⁵, andererseits solche, die einen inhibierenden Effekt von Calcitriol auf die IL-4-Produktion bei naiven murinen T_H2-polarsierten Zellen darstellen¹⁷⁵.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen, dass die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ T_H2-Immunantworten verstärkt^{117, 123}. Da T_H2-Antworten über eine

verstärkte Expression von GATA3 auch zu einer vermehrten Freisetzung von IL-4 führen¹⁷ und dieses für den Klassenwechsel zu IgE benötigt wird^{183, 216}, wären die höheren IgE-Werte anstatt bei den Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren, bei den Cyp27b1^{+/+}-Mäusen zu erwarten gewesen. Da dies in unseren Untersuchungen nicht der Fall war, existieren möglicherweise über GATA3 hinaus weitere Wege, wie Calcitriol die IL-4-Produktion modulieren kann. So zeigen beispielsweise Staeva-Vieira et al., dass der VDR direkt die Transkription des *IL-4*-Promotors herunterregulieren kann¹⁷⁵. Anhand dieser Quelle ließen sich die Ergebnisse unserer Untersuchungen, Abschwächung der T_H2-Antwort bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren bei gleichzeitiger Erhöhung der IgE-Freisetzung, durch eine fehlende Herabregulation des *IL-4*-Promotors durch den VDR erklären. Um diese Hypothese zu bestätigen, wäre ein Profil des Zytokins IL-4 notwendig.

Auch die Rolle von IL-10 könnte für eine Erklärung der ermittelten Unterschiede zwischen IgG₁ und IgE herangezogen werden. Studien von Jeannin et al. mit humanen PBMCs zeigen, dass IL-10 die IgE-Produktion über eine Verminderung der Expression des ϵ -Transkripts verringert. Ebenso wurde von den Autoren eine verstärkte Produktion von IgG₄, was dem murinen IgG₁ entspricht²¹⁷, durch IL-10 beobachtet²¹⁸. Ergänzend zeigen Analysen von Punnonen et al. mit humanen PBMCs, dass IL-10 die IL-4-induzierte Synthese des ϵ -Keimbahntranskripts inhibiert und so eine Verringerung der IgE-Produktion bewirkt²¹⁹. Diese Ergebnisse spiegeln sich in unseren Daten der *H.p. bakeri*-spezifischen Immunglobulinantworten sowie Zytokinmessungen aus Vorversuchen wider: Cyp27b1^{-/-}-Mäuse haben bedingt durch den Vitamin D-Mangel eine geringere IL-10-Freisetzung, was zu den beobachteten niedrigeren IgG₁- und erhöhten IgE-Konzentrationen geführt haben könnte.

Untersuchungen zur Rolle von IgA legen nahe, dass das Immunglobulin keinen bedeutenden Einfluss auf die Abwehr des Nematoden *H.p. bakeri* hat²⁴, obwohl sich dessen Lebenszyklus zu einem großen Teil im Darmlumen des Wirtes abspielt²⁹. IgA stellt die am stärksten vertretene Immunglobulinklasse im Darmlumen von Menschen und anderen Säugetieren dar²²⁰. In unseren Untersuchungen mit *H.p. bakeri*-infizierten Cyp27b1^{+/+}- und Cyp27b1^{-/-}-Tieren war im Verlauf der Gesamt-IgA-Antwort bei keinem der beiden Genotypen eine Reaktion im Sinne eines Anstiegs auf die Infektion erkennbar (Abb. 19c). Interessanterweise zeigt der Verlauf von Gesamt-IgA tendenziell höhere, jedoch nicht signifikant erhöhte Werte bei den Cyp27b1^{+/+}-Tieren, verglichen mit den Werten der Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tiere. Eine

mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte das von Vitamin D beeinflusste Homing der IgA-Antikörper-sezernierenden Zellen sein. Diese exprimieren den Chemokin-Rezeptor CCR10, der es ihnen erlaubt auf das Chemokin CCL28 anzusprechen, welches neben anderen Mukosa-assoziierten Geweben auch im Darm exprimiert wird^{221, 222}. Studien von Shirakawa et al. haben gezeigt, dass der Chemokin-Rezeptor CCR10 bei B-Zellen durch Calcitriol induziert wird²²³. Dies könnte für unser Modell bedeuten, dass B-Zellen der Wildtyp-Mäuse, verglichen mit denen der Cyp27b1^{-/-}-Tiere, eventuell vermehrt in den Darm einwandern und zu IgA-produzierenden Plasmazellen differenzieren. Um dies zu verifizieren, wäre es für nachfolgende Untersuchungen notwendig, die Anzahl der IgA-Antikörper-sezernierenden-Zellen im Darm zu messen.

Die Werte des *H.p. bakeri*-spezifischen IgA zeigen bei beiden Genotypen einen Anstieg nach der primären sowie der sekundären Infektion (Abb. 20c). Auch hier war der Unterschied zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant. Dennoch scheinen Cyp27b1^{-/-}-Tiere, trotz großer Schwankungen zwischen den Tieren der beiden Genotypen untereinander, tendenziell mit einer stärkeren *H.p. bakeri*-spezifischen IgA-Freisetzung auf die Infektion zu reagieren. Der Klassenwechsel zu IgA benötigt das Zytokin TGF- β , welches von CD4⁺ T-Zellen freigesetzt wird. Durch Bindung des Zytokins an seinen Rezeptor (TGF β R) wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur Phosphorylierung von *mothers against decapentaplegic homologue* (SMAD)-Proteinen führen, welche daraufhin an SMAD-binding elements in der Promotorregion ihrer Zielgene binden. Dazu gehört auch der Promotor der konstanten schweren Kette (C α) des IgA-Moleküls¹⁷⁷. Durch Studien ist bekannt, dass 1,25(OH)₂D₃ den TGF- β -Signalweg negativ beeinflussen kann²²⁴⁻²²⁶. Dies geschieht nach Untersuchungen von Ito et al. durch Bindung des VDR an SMAD3, wodurch dessen Interaktion mit Promotorregionen von TGF- β -Zielgenen unterdrückt und deren Expression somit supprimiert wird²²⁶. Diese Ergebnisse stellen eine Erklärung für die gegenüber Cyp27b1^{+/+}-Wildtyp-Tieren tendenziell erhöhten spezifischen IgA-Werte bei Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren dar, da bei diesen möglicherweise durch die fehlende hemmende Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ auf den TGF- β -Signalweg vermehrt die konstante schwere Kette (C α) des IgA-Moleküls exprimiert wird.

Der Vergleich der Verläufe von Gesamt-IgA und *H.p. bakeri*-spezifischem IgA zeigt, dass Cyp27b1^{+/+}-Tiere tendenziell mehr Gesamt-IgA produzieren während Cyp27b1^{-/-}-Tiere

^{-/-}-Mäuse höhere Werte des *H.p. bakeri*-spezifischen IgA aufweisen. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, kann jedoch dadurch begründet werden, dass spezifisches IgA nur einen geringen Teil des Gesamt-IgA darstellt, dementsprechend also keinen starken Einfluss auf die Gesamt-IgA-Werte ausübt, die zudem eine große Spannweite der beiden Genotypen untereinander aufzeigen.

Die nach Infektion von Cyp27b1^{+/+} - und Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren mit dem Nematoden *H.p. bakeri* erhaltenen Daten verifizieren erneut, dass Calcitriol die Bildung von IgE negativ reguliert^{128, 129} und ein Vitamin D-Mangel eine erhöhte Produktion des Immunglobulins E begünstigt. Unsere Untersuchungen bestätigen darüber hinaus, dass IgE bei der Abwehr von *H.p. bakeri* keine zentrale Rolle zu spielen scheint²⁴. Um den Einfluss von Vitamin D während einer Parasiteninfektion besser untersuchen zu können, wäre es sinnvoll, ein stärker IgE-abhängiges Modell zu wählen. Dies könnte beispielsweise die Infektion von Cyp27b1^{+/+} - und Vitamin D-defizienten Cyp27b1^{-/-}-Tieren mit dem Trematoden *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) sein. In Untersuchungen mit Wildtyp- und IgE-defizienten Mäusen, die mit *S. mansoni* infiziert wurden, zeigten IgE-defiziente-Tiere eine höhere Wurmlast verglichen mit Wildtyp-Tieren, was nahelegt, dass IgE in diesem Modell eine Rolle bei der Abwehr der Parasiten zu spielen scheint²²⁷.

Zusammenfassend legen die vorgelegten Daten die Vermutung nahe, dass in unserem Modell Vitamin D keinen nachweisbaren Einfluss auf den Ausgang der akuten und chronischen Infektion mit dem Parasiten *Heligmosomoides polygyrus bakeri* hat.

8 Literatur

Online-Referenz der University of Birmingham zur Auswertung der HEP2-Färbungen von Autoantikörpern gegen nukleäre und zytoplasmatische Antigene:

<http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity/hep-2-image-library/nucleolar.aspx>

1. Igea JM. The history of the idea of allergy. *Allergy* 2013; 68:966-73.
2. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:205-17.
3. Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:109-13.
4. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:30-7.
5. Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. *Immunol Rev* 2006; 212:238-55.
6. Augustin M, Franzke N, Beikert FC, Stadler R, Reusch M, Schmitt J, et al. Allergies in Germany -- prevalence and perception by the public. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013; 11:514-20.
7. Murphy KP. *Janeway's Immunobiology*. 8 ed: Garland Science; 2012.
8. Yoo Y, Perzanowski MS. Allergic sensitization and the environment: latest update. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; 14:465.
9. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S73-80.
10. Xiong H, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. What is unique about the IgE response? *Adv Immunol* 2012; 116:113-41.
11. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 2012; 106:9-14.

12. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; 454:445-54.
13. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012; 18:693-704.
14. Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:446-53.
15. Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:440-52.
16. Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defences. *Nature* 2012; 484:465-72.
17. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 2010; 10:225-35.
18. Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science* 2012; 337:431-5.
19. Phillips C, Coward WR, Pritchard DI, Hewitt CR. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *J Leukoc Biol* 2003; 73:165-71.
20. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007; 13:913-9.
21. Palm NW, Rosenstein RK, Yu S, Schenten DD, Florsheim E, Medzhitov R. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity* 2013; 39:976-85.
22. Akahoshi M, Song CH, Piliponsky AM, Metz M, Guzzetta A, Abrink M, et al. Mast cell chymase reduces the toxicity of Gila monster venom, scorpion venom, and vasoactive intestinal polypeptide in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:4180-91.

-
23. Pepys J. Types of allergic reaction. Clin Allergy 1973; 3 Suppl:491-509.
 24. McCoy KD, Stoel M, Stettler R, Merky P, Fink K, Senn BM, et al. Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. Cell Host Microbe 2008; 4:362-73.
 25. Marichal T, Starkl P, Reber LL, Kalesnikoff J, Oettgen HC, Tsai M, et al. A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. Immunity 2013; 39:963-75.
 26. Ehrenford FA. The Life Cycle of *Nematospiroides dubius* Baylis (Nematoda: Heligmosomidae). The Journal of Parasitology 1954; 40:2.
 27. Harris NL, Pleass R, Behnke JM. Understanding the role of antibodies in murine infections with *Heligmosomoides (polygyrus) bakeri*: 35 years ago, now and 35 years ahead. Parasite Immunol 2014; 36:115-24.
 28. Maizels RM, Hewitson JP, Murray J, Harcus YM, Dayer B, Filbey KJ, et al. Immune modulation and modulators in *Heligmosomoides polygyrus* infection. Exp Parasitol 2012; 132:76-89.
 29. Reynolds LA, Filbey KJ, Maizels RM. Immunity to the model intestinal helminth parasite *Heligmosomoides polygyrus*. Semin Immunopathol 2012; 34:829-46.
 30. Bansemir AD, Sukhdeo MV. The food resource of adult *Heligmosomoides polygyrus* in the small intestine. J Parasitol 1994; 80:24-8.
 31. Urban JF, Jr., Katona IM, Finkelman FD. *Heligmosomoides polygyrus*: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice. Exp Parasitol 1991; 73:500-11.
 32. Rausch S, Huehn J, Kirchhoff D, Rzepecka J, Schnoeller C, Pillai S, et al. Functional analysis of effector and regulatory T cells in a parasitic nematode infection. Infect Immun 2008; 76:1908-19.
 33. Setiawan T, Metwali A, Blum AM, Ince MN, Urban JF, Jr., Elliott DE, et al. *Heligmosomoides polygyrus* promotes regulatory T-cell cytokine production in the murine normal distal intestine. Infect Immun 2007; 75:4655-63.

-
34. Grainger JR, Smith KA, Hewitson JP, McSorley HJ, Hargus Y, Filbey KJ, et al. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J Exp Med* 2010; 207:2331-41.
 35. Hang L, Blum AM, Setiawan T, Urban JP, Jr., Stoyanoff KM, Weinstock JV. *Heligmosomoides polygyrus bakeri* infection activates colonic Foxp3+ T cells enhancing their capacity to prevent colitis. *J Immunol* 2013; 191:1927-34.
 36. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009; 21:1105-11.
 37. Finney CA, Taylor MD, Wilson MS, Maizels RM. Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur J Immunol* 2007; 37:1874-86.
 38. Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 2004; 201:89-116.
 39. Wojciechowski W, Harris DP, Sprague F, Mousseau B, Makris M, Kusser K, et al. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity* 2009; 30:421-33.
 40. Anthony RM, Urban JF, Jr., Alem F, Hamed HA, Roza CT, Boucher JL, et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 2006; 12:955-60.
 41. Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, Ehst BD, Ingulli E, Rudensky AY, et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 2003; 19:47-57.
 42. Harris N, Gause WC. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol* 2011; 32:80-8.
 43. Liu Q, Kreider T, Bowdridge S, Liu Z, Song Y, Gaydo AG, et al. B cells have distinct roles in host protection against different nematode parasites. *J Immunol* 2010; 184:5213-23.

-
44. Zhong S, Dobson C. *Heligmosomoides polygyrus*: resistance in inbred, outbred, and selected mice. *Exp Parasitol* 1996; 82:122-31.
 45. Pritchard DI, Williams DJ, Behnke JM, Lee TD. The role of IgG1 hypergammaglobulinaemia in immunity to the gastrointestinal nematode *Nematospiroides dubius*. The immunochemical purification, antigen-specificity and in vivo anti-parasite effect of IgG1 from immune serum. *Immunology* 1983; 49:353-65.
 46. Wahid FN, Behnke JM. Stimuli for acquired resistance to *Heligmosomoides polygyrus* from intestinal tissue resident L3 and L4 larvae. *Int J Parasitol* 1992; 22:699-710.
 47. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 167:1-11.
 48. Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* 2007; 37:1887-904.
 49. Wilson MS, Taylor MD, O'Gorman MT, Balic A, Barr TA, Filbey K, et al. Helminth-induced CD19⁺CD23^{hi} B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *Eur J Immunol* 2010; 40:1682-96.
 50. Hewitson JP, Harcus Y, Murray J, van Agtmaal M, Filbey KJ, Grainger JR, et al. Proteomic analysis of secretory products from the model gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* reveals dominance of venom allergen-like (VAL) proteins. *J Proteomics* 2011; 74:1573-94.
 51. McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int J Parasitol* 2013; 43:301-10.
 52. Osada Y, Yamada S, Nabeshima A, Yamagishi Y, Ishiwata K, Nakae S, et al. *Heligmosomoides polygyrus* infection reduces severity of type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in mice via STAT6- and IL-10-independent mechanisms. *Exp Parasitol* 2013; 135:388-96.

-
53. Liu Q, Sundar K, Mishra PK, Mousavi G, Liu Z, Gaydo A, et al. Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms. *Infect Immun* 2009; 77:5347-58.
 54. Leung J, Hang L, Blum A, Setiawan T, Stoyanoff K, Weinstock J. *Heligmosomoides polygyrus* abrogates antigen-specific gut injury in a murine model of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18:1447-55.
 55. Blum AM, Hang L, Setiawan T, Urban JP, Jr., Stoyanoff KM, Leung J, et al. *Heligmosomoides polygyrus bakeri* induces tolerogenic dendritic cells that block colitis and prevent antigen-specific gut T cell responses. *J Immunol* 2012; 189:2512-20.
 56. McSorley HJ, O'Gorman MT, Blair N, Sutherland TE, Filbey KJ, Maizels RM. Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Eur J Immunol* 2012; 42:2667-82.
 57. Hartmann S, Schnoeller C, Dahten A, Avagyan A, Rausch S, Lendner M, et al. Gastrointestinal nematode infection interferes with experimental allergic airway inflammation but not atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1585-96.
 58. O'Riordan JL, Bijvoet OL. Rickets before the discovery of vitamin D. *Bonekey Rep* 2014; 3:478.
 59. Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 2004; 134:1299-302.
 60. McCollum E.V. SN, Becker J. E., Shipley P.G. Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *Journal of Biological Chemistry* 1922; 53:293-312.
 61. DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev* 2008; 66:S73-87.
 62. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum

- 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2012; 95:1357-64.
63. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, et al. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980; 210:203-5.
64. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F8-28.
65. Tai C, Chen ZL, Michael F, Holick. *Nutrition and Health: Vitamin D Chapter 2: Photobiology of Vitamin D* 2010.
66. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 1993; 91:2552-5.
67. Ponchon G, Kennan AL, DeLuca HF. "Activation" of vitamin D by the liver. *J Clin Invest* 1969; 48:2032-7.
68. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:7711-5.
69. Brunette MG, Chan M, Ferriere C, Roberts KD. Site of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ synthesis in the kidney. *Nature* 1978; 276:287-9.
70. Fraser DR, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* 1970; 228:764-6.
71. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D₃ metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:803-4.
72. Lehmann B, Meurer M. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther* 2010; 23:2-12.
73. Inouye K, Sakaki T. Enzymatic studies on the key enzymes of vitamin D metabolism; 1 alpha-hydroxylase (CYP27B1) and 24-hydroxylase (CYP24). *Biotechnol Annu Rev* 2001; 7:179-94.

-
74. Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, et al. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev* 2008; 66:S98-112.
 75. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:3294-8.
 76. McDonnell DP, Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* 1987; 235:1214-7.
 77. McDonnell DP, Scott RA, Kerner SA, O'Malley BW, Pike JW. Functional domains of the human vitamin D3 receptor regulate osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 1989; 3:635-44.
 78. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:684-700.
 79. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25:543-59.
 80. Gilardi F, Desvergne B. RXRs: collegial partners. *Subcell Biochem* 2014; 70:75-102.
 81. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Rheum Dis Clin North Am* 2012; 38:13-27.
 82. Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev* 2013; 65:710-78.
 83. Hsieh JC, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Haussler CA, Jurutka PW, et al. Novel nuclear localization signal between the two DNA-binding zinc fingers in the human vitamin D receptor. *J Cell Biochem* 1998; 70:94-109.

-
84. Yasmin R, Williams RM, Xu M, Noy N. Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor, and their mutual heterodimer. *J Biol Chem* 2005; 280:40152-60.
 85. Barsony J, Pike JW, DeLuca HF, Marx SJ. Immunocytochemistry with microwave-fixed fibroblasts shows 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent rapid and estrogen-dependent slow reorganization of vitamin D receptors. *J Cell Biol* 1990; 111:2385-95.
 86. Cheskis B, Freedman LP. Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D₃ receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* 1994; 14:3329-38.
 87. Prufer K, Racz A, Lin GC, Barsony J. Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J Biol Chem* 2000; 275:41114-23.
 88. Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal* 2009; 2:re4.
 89. Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004; 18:2660-71.
 90. Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW. Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 1994; 269:23750-6.
 91. Richard CL, Farach-Carson MC, Rohe B, Nemere I, Meckling KA. Involvement of 1,25D₃-MARRS (membrane associated, rapid response steroid-binding), a novel vitamin D receptor, in growth inhibition of breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2010; 316:695-703.

-
92. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29:726-76.
 93. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3:58.
 94. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in target cells. *Endocrinology* 1988; 122:1224-30.
 95. St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473:225-30.
 96. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25:585-91.
 97. Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol* 2003; 17:777-91.
 98. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 2016; 96:365-408.
 99. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10:482-96.
 100. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1689S-96S.
 101. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
 102. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013; 5:2502-21.
 103. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76:315-25.

-
104. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170:5382-90.
 105. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311:1770-3.
 106. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood* 2003; 102:3314-6.
 107. Pedersen AW, Holmstrom K, Jensen SS, Fuchs D, Rasmussen S, Kvistborg P, et al. Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2009; 157:48-59.
 108. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164:2405-11.
 109. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 2006; 36:361-70.
 110. Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprinì C, Rocchi G, Bergamini A. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine* 2009; 45:190-7.
 111. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine* 1992; 4:506-12.
 112. Ohta M, Okabe T, Ozawa K, Urabe A, Takaku F. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) stimulates proliferation of human circulating monocytes in vitro. *FEBS Lett* 1985; 185:9-13.

-
113. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4:80-90.
 114. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004; 173:2909-12.
 115. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Buchau AS, Liu PT, Kiken D, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007; 117:803-11.
 116. Suaini NH, Zhang Y, Vuillermin PJ, Allen KJ, Harrison LC. Immune Modulation by Vitamin D and Its Relevance to Food Allergy. *Nutrients* 2015; 7:6088-108.
 117. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:685-98.
 118. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374:334-8.
 119. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 2012; 523:123-33.
 120. Bhalla AK, Amento EP, Krane SM. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. *Cell Immunol* 1986; 98:311-22.
 121. Rigby WF, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Clin Invest* 1984; 74:1451-5.
 122. Meehan MA, Kerman RH, Lemire JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the generation of nonspecific suppressor cells while inhibiting the induction of cytotoxic cells in a human MLR. *Cell Immunol* 1992; 140:400-9.
 123. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167:4974-80.

-
124. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009; 183:5458-67.
 125. Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 2005; 106:3490-7.
 126. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity* 2009; 31:438-49.
 127. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179:1634-47.
 128. Hartmann B, Heine G, Babina M, Steinmeyer A, Zugel U, Radbruch A, et al. Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy* 2011; 66:540-8.
 129. Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32:3395-404.
 130. Milovanovic M, Heine G, Hallatschek W, Opitz B, Radbruch A, Worm M. Vitamin D receptor binds to the epsilon germline gene promoter and exhibits transrepressive activity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:1016-23, 23 e1-4.
 131. Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 2002; 23:31-9.
 132. Jones AP, Tulic MK, Rueter K, Prescott SL. Vitamin D and allergic disease: sunlight at the end of the tunnel? *Nutrients* 2012; 4:13-28.
 133. Mirzakhani H, Al-Garawi A, Weiss ST, Litonjua AA. Vitamin D and the development of allergic disease: how important is it? *Clin Exp Allergy* 2015; 45:114-25.

-
134. Chaplin G, Jablonski NG. Vitamin D and the evolution of human depigmentation. *Am J Phys Anthropol* 2009; 139:451-61.
 135. Mullins RJ, Camargo CA. Latitude, sunlight, vitamin D, and childhood food allergy/anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012; 12:64-71.
 136. Lim WC, Hanauer SB, Li YC. Mechanisms of disease: vitamin D and inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:308-15.
 137. Hayes CE, Cantorna MT, DeLuca HF. Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216:21-7.
 138. Staples JA, Ponsonby AL, Lim LL, McMichael AJ. Ecologic analysis of some immune-related disorders, including type 1 diabetes, in Australia: latitude, regional ultraviolet radiation, and disease prevalence. *Environ Health Perspect* 2003; 111:518-23.
 139. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:373-8.
 140. Signorello LB, Shi J, Cai Q, Zheng W, Williams SM, Long J, et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One* 2011; 6:e28623.
 141. Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:1031-5.
 142. Wjst M. The vitamin D slant on allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17:477-83.
 143. Searing DA, Leung DY. Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010; 30:397-409.
 144. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133:775-87.

-
145. Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, St-Arnaud R. Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(alpha)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* 2001; 142:3135-41.
 146. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 2014; 55:13-31.
 147. Jacobs ET, Van Pelt C, Forster RE, Zaidi W, Hibler EA, Galligan MA, et al. CYP24A1 and CYP27B1 polymorphisms modulate vitamin D metabolism in colon cancer cells. *Cancer Res* 2013; 73:2563-73.
 148. Dardenne O, Prud'homme J, Glorieux FH, St-Arnaud R. Rescue of the phenotype of CYP27B1 (1alpha-hydroxylase)-deficient mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90:327-30.
 149. Kollenkirchen U, Walters MR, Fox J. Plasma Ca influences vitamin D metabolite levels as rats develop vitamin D deficiency. *Am J Physiol* 1991; 260:E447-52.
 150. Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, et al. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:7498-503.
 151. Mathieu C, Van Etten E, Gysemans C, Decallonne B, Kato S, Laureys J, et al. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res* 2001; 16:2057-65.
 152. Verma IM. Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses III. Properties of purified Moloney murine leukemia virus DNA polymerase and associated RNase H. *J Virol* 1975; 15:843-54.
 153. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 2013; 133:e6.
 154. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003; 4:1120-8.

-
155. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132:365-86.
 156. Everaert BR, Boulet GA, Timmermans JP, Vrints CJ. Importance of suitable reference gene selection for quantitative real-time PCR: special reference to mouse myocardial infarction studies. *PLoS One* 2011; 6:e23793.
 157. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45.
 158. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
 159. Nicholas MW, Nelson K. North, south, or east? Blotting techniques. *J Invest Dermatol* 2013; 133:e10.
 160. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* 2013; 133:e12.
 161. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow cytometry. *J Invest Dermatol* 2012; 132:e1.
 162. Peine M, Rausch S, Helmstetter C, Frohlich A, Hegazy AN, Kuhl AA, et al. Stable T-bet(+)GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation. *PLoS Biol* 2013; 11:e1001633.
 163. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4:404-12.
 164. Shoenfeld N, Amital H, Shoenfeld Y. The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009; 5:99-105.
 165. Alshahrani F, Aljohani N. Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity. *Nutrients* 2013; 5:3605-16.

-
166. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, Qiao S, Kalueff AV, St-Arnaud R, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 118:162-70.
 167. Herz U, Braun A, Ruckert R, Renz H. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:625-34.
 168. Herz U, Renz H, Wiedermann U. Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods* 2004; 32:271-80.
 169. Geldmeyer-Hilt K. Vitamin D inhibits NF- κ B activation in B cells and controls the humoral immune response. Technische Universität Berlin, 2011:81.
 170. Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res* 2009; 58:845-54.
 171. Wittke A, Weaver V, Mahon BD, August A, Cantorna MT. Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. *J Immunol* 2004; 173:3432-6.
 172. Moon HB, Severinson E, Heusser C, Johansson SG, Moller G, Persson U. Regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4 in mouse B cells. *Scand J Immunol* 1989; 30:355-61.
 173. Fischer K, Collins H, Taniguchi M, Kaufmann SH, Schaible UE. IL-4 and T cells are required for the generation of IgG1 isotype antibodies against cardiolipin. *J Immunol* 2002; 168:2689-94.
 174. Siebenkotten G, Esser C, Wabl M, Radbruch A. The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* 1992; 22:1827-34.
 175. Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN- γ and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2002; 168:1181-9.

-
176. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 1994; 264:561-3.
 177. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:421-34.
 178. Sato A, Hashiguchi M, Toda E, Iwasaki A, Hachimura S, Kaminogawa S. CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol* 2003; 171:3684-90.
 179. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:23-33.
 180. Heine G, Tabeling C, Hartmann B, Gonzalez Calera CR, Kuhl AA, Lindner J, et al. 25-hydroxitamin D3 promotes the long-term effect of specific immunotherapy in a murine allergy model. *J Immunol* 2014; 193:1017-23.
 181. Vernino L, McAnally LM, Ramberg J, Lipsky PE. Generation of nondividing high rate Ig-secreting plasma cells in cultures of human B cells stimulated with anti-CD3-activated T cells. *J Immunol* 1992; 148:404-10.
 182. Kelly BL, Locksley RM. Coordinate regulation of the IL-4, IL-13, and IL-5 cytokine cluster in Th2 clones revealed by allelic expression patterns. *J Immunol* 2000; 165:2982-6.
 183. Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4. *Immunol Rev* 1988; 102:51-75.
 184. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:261-92.
 185. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003; 89:922-32.

-
186. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* 2003; 17:2386-92.
 187. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zugel U, Zuberbier T, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol* 2008; 38:2210-8.
 188. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; 3:944-50.
 189. Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 2007; 27:145-59.
 190. Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A* 2013; 83:692-701.
 191. Sylvia VL, Schwartz Z, Curry DB, Chang Z, Dean DD, Boyan BD. 1,25(OH)₂D₃ regulates protein kinase C activity through two phospholipid-dependent pathways involving phospholipase A₂ and phospholipase C in growth zone chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1998; 13:559-69.
 192. Lewis RS. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:497-521.
 193. Habib T, Park H, Tsang M, de Alboran IM, Nicks A, Wilson L, et al. Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J Cell Biol* 2007; 179:717-31.
 194. Baba Y, Kurosaki T. Impact of Ca²⁺ signaling on B cell function. *Trends Immunol* 2011; 32:589-94.
 195. Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:778-89.
 196. Niu H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematol Oncol* 2002; 20:155-66.

-
197. Peacock M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5 Suppl 1:S23-30.
 198. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397:315-23.
 199. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143:123-50.
 200. Lewis JG, Elder PA. Serum 25-OH vitamin D2 and D3 are stable under exaggerated conditions. *Clin Chem* 2008; 54:1931-2.
 201. Riaz MN, Asif M, Ali R. Stability of vitamins during extrusion. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; 49:361-8.
 202. Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM, et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells. *J Biol Chem* 2011; 286:997-1004.
 203. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453:1051-7.
 204. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007; 179:4313-7.
 205. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8:967-74.
 206. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011; 11:29-36.
 207. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199:971-9.

-
208. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:92-9.
 209. Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ, Koeffler HP. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin Immunol* 2001; 99:82-93.
 210. Erb KJ. Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand? *Eur J Immunol* 2007; 37:1170-3.
 211. Kong J, Zhang Z, Li D, Wong KE, Zhang Y, Szeto FL, et al. Loss of vitamin D receptor produces polyuria by increasing thirst. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:2396-405.
 212. Ho IC, Tai TS, Pai SY. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:125-35.
 213. Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, Gokmen MR, Perucha E, Jackson I, et al. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun* 2012; 3:1268.
 214. Sloka S, Silva C, Wang J, Yong VW. Predominance of Th2 polarization by vitamin D through a STAT6-dependent mechanism. *J Neuroinflammation* 2011; 8:56.
 215. Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1984; 74:657-61.
 216. Finkelman FD, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Schooley KA, Holmes JM, Katona IM. Regulation of murine in vivo IgG and IgE responses by a monoclonal anti-IL-4 receptor antibody. *Int Immunol* 1991; 3:599-607.
 217. Hussain R, Dawood G, Abrar N, Toossi Z, Minai A, Dojki M, et al. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to

- secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2:726-32.
218. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 1998; 160:3555-61.
219. Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat JF, de Vries JE. IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol* 1993; 151:1280-9.
220. Mantis NJ, Rol N, Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 2011; 4:603-11.
221. Wang W, Soto H, Oldham ER, Buchanan ME, Homey B, Catron D, et al. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* 2000; 275:22313-23.
222. Sigmundsdottir H, Butcher EC. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 2008; 9:981-7.
223. Shirakawa AK, Nagakubo D, Hieshima K, Nakayama T, Jin Z, Yoshie O. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces CCR10 expression in terminally differentiating human B cells. *J Immunol* 2008; 180:2786-95.
224. Luderer HF, Nazarian RM, Zhu ED, Demay MB. Ligand-dependent actions of the vitamin D receptor are required for activation of TGF-beta signaling during the inflammatory response to cutaneous injury. *Endocrinology* 2013; 154:16-24.
225. Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Huang J, Distler A, et al. Vitamin D receptor regulates TGF-beta signalling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74:e20.
226. Ito I, Waku T, Aoki M, Abe R, Nagai Y, Watanabe T, et al. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *J Clin Invest* 2013; 123:4579-94.

-
227. King CL, Xianli J, Malhotra I, Liu S, Mahmoud AA, Oettgen HC. Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1997; 158:294-300.
 228. Yamashita I, Nagata T, Tada T, Nakayama T. CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol* 1993; 5:1139-50.
 229. Lauzurica P, Sancho D, Torres M, Albella B, Marazuela M, Merino T, et al. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* 2000; 95:2312-20.
 230. Kohm AP, Mozaffarian A, Sanders VM. B cell receptor- and beta 2-adrenergic receptor-induced regulation of B7-2 (CD86) expression in B cells. *J Immunol* 2002; 168:6314-22.
 231. Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, et al. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 1997; 186:47-55.
 232. Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5:572-7.
 233. Otero DC, Rickert RC. CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *J Immunol* 2003; 171:5921-30.
 234. Yabas M, Teh CE, Frankenreiter S, Lal D, Roots CM, Whittle B, et al. ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes. *Nat Immunol* 2011; 12:441-9.
 235. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:441-51.
 236. McHeyzer-Williams LJ, Milpied PJ, Okitsu SL, McHeyzer-Williams MG. Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat Immunol* 2015; 16:296-305.

-
237. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:595-621.
 238. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:107-16.
 239. Hardy RR, Kincade PW, Dorshkind K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 2007; 26:703-14.
 240. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112:1557-69.
 241. Xu D, Liu H, Komai-Koma M, Campbell C, McSharry C, Alexander J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J Immunol* 2003; 170:394-9.
 242. Dutt S, Baker J, Kohrt HE, Kambham N, Sanyal M, Negrin RS, et al. CD8+CD44(hi) but not CD4+CD44(hi) memory T cells mediate potent graft antilymphoma activity without GVHD. *Blood* 2011; 117:3230-9.
 243. Yuzefpolskiy Y, Baumann FM, Kalia V, Sarkar S. Early CD8 T-cell memory precursors and terminal effectors exhibit equipotent in vivo degranulation. *Cell Mol Immunol* 2015; 12:400-8.
 244. Xie Y, Zhang X, Zhao T, Li W, Xiang J. Natural CD8(+)25(+) regulatory T cell-secreted exosomes capable of suppressing cytotoxic T lymphocyte-mediated immunity against B16 melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 438:152-5.
 245. Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72:55-66.
 246. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 2014; 15:929-37.

-
247. Jiang D, Schwarz H. Regulation of granulocyte and macrophage populations of murine bone marrow cells by G-CSF and CD137 protein. *PLoS One* 2010; 5:e15565.
 248. Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest* 2011; 121:1484-96.
 249. Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *J Immunol* 2006; 176:2085-94.
 250. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; 179:5228-37.
 251. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.
 252. Ferrero I, Held W, Wilson A, Tacchini-Cottier F, Radtke F, MacDonald HR. Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood* 2002; 100:2852-7.

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm für die Überlassung dieses Themas sowie die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe an der Charité Berlin durchzuführen, bedanken. Weiterhin danke ich Frau Prof. Worm für ihre Unterstützung und Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Kai Matuschewski für die Bereitschaft meine Arbeit zu betreuen.

Ein Dankeschön an Herrn PD. Dr. med. Guido Heine für das Bekanntmachen mit dem Gebiet der Vitamin D-Forschung und zahlreiche Diskussionen.

Danke auch an Frau Dr. rer. nat. Magda Babina für viele nützliche Hinweise.

Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Hartmann, im Besonderen Dr. rer. nat. Sebastian Rausch, danke ich sehr für die nette Zusammenarbeit während der Untersuchung der *H.p.bakeri*-Infektion bei unseren Mäusen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Fritz Melchers, besonders Jana Winckler, danke ich für die durchflusszytometrische Untersuchung der Leukopoese unserer Mäuse.

Ein besonderer Dank an Dennis Ernst, der scheinbar alles weiß und alles kann und mir immer mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Einen großen Dank an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Worm, vor allem Dr. rer. nat. Kristin Franke, Dr. rer. nat. Maria Nassiri, Dr. rer. nat. Vandana Kumari, Davender, Tarek Hazzan, Marina Aparicio Soto, Josephine Scholz und Wojciech Francuzik.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Büromitstreitern Sandra Treptow und Tina Krause für die vielen lustigen Momente, die gegenseitigen Aufmunterungen und Analysen sowie das eine oder andere Stück Kuchen.

Besonders danken möchte ich Dr. rer. nat. Kristin Franke für ihre Hilfe und wertvollen Anmerkungen bei den Korrekturen dieser Arbeit sowie Katja Knoll für ihre Unterstützung bei der Korrektur der Summary.

Mein Dank gilt auch vielen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Worm, vor allem Dr. rer. nat. Christin Weise für ihre zahlreichen Hilfestellungen und Dr. rer. nat. Kerstin Geldmeyer für ihre Erklärungen und Anleitungen zu Beginn meiner Arbeit. Außerdem möchte ich Dr. rer. nat. Björn Hartmann, Dr. rer. nat. Gennadiy Drozdenko und Dr. rer. nat. Kiran Kumar danken.

Der größte Dank gilt aber meiner Familie, besonders meinen Eltern, für ihr Interesse, ihre Geduld und ihre Unterstützung in dieser Zeit.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Juliane Lindner, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

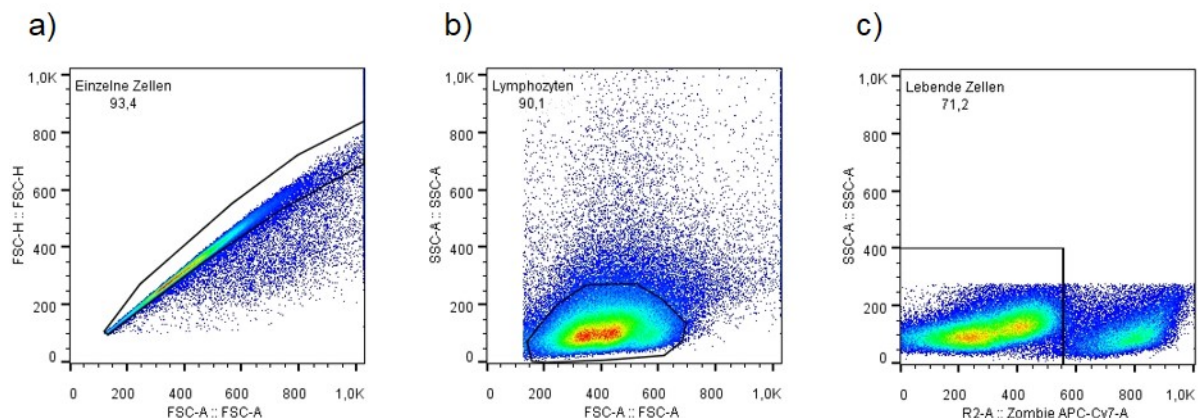
Berlin, den 10.05.2016

Juliane Lindner

11 Anhang

11.1 Nachweis aktivierter B- und T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

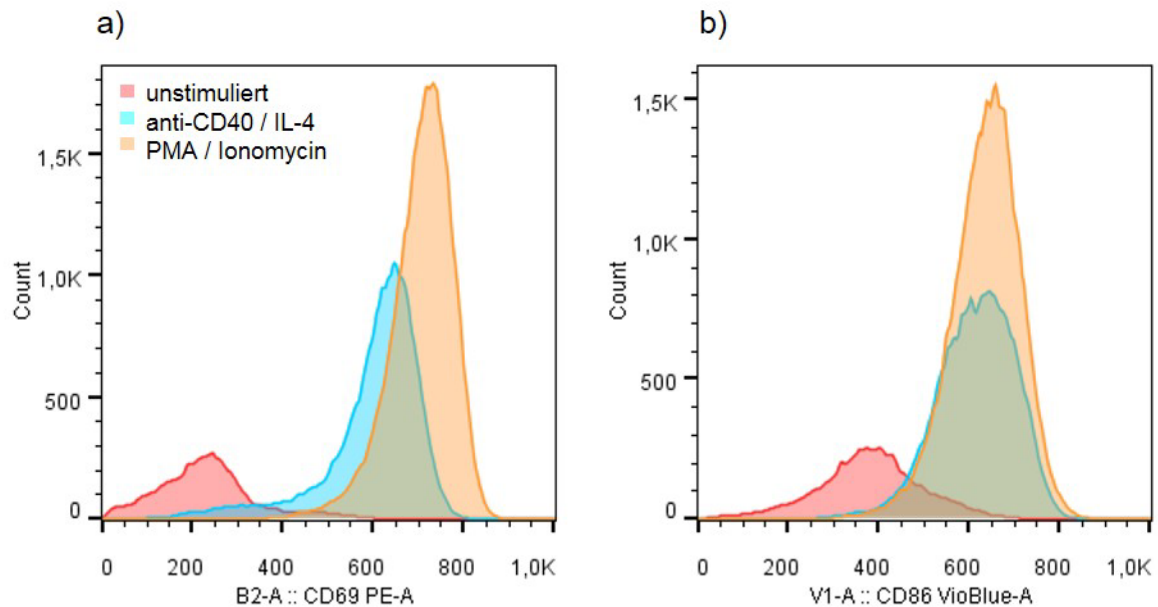
Um das Aktivierungspotenzial der für die zellbiologischen Arbeiten gewählten Stimulantien gegenüber murinen B- und T-Lymphozyten zu zeigen, wurden jeweils 1×10^6 Splenozyten B-Zell-spezifisch mit 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD40 und 20 ng/ml IL-4 bzw. T-Zell-spezifisch mit 3 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 und 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28 24 h stimuliert. Als Kontrollen wurden dabei unstimulierte sowie mit 20 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 149 ng/ml Ionomycin stimulierte Splenozyten verwendet. Bei der Färbung der Zellen zur Untersuchung des Aktivierungsstatus erfolgte zunächst die Zugabe von anti-Fcy-Rezeptor zum Vermeiden unspezifischer Bindungen. Zum Differenzieren von B- und T-Zellen wurden die Zellen anschließend mit anti-B220 und anti-CD4 gefärbt. Als Marker für die Aktivierung dienten CD69^{228, 229}, CD86²³⁰ und CD137²³¹. Die Abgrenzung von toten Zellen erfolgte durch deren Färbung mit Zombie NIRTM. Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurden zunächst die Dubletten ausgeschlossen und anschließend die lebenden Zellen aus der Lymphozytenpopulation eingegrenzt (Anhang Abb. I).



Anhang Abb. I: Gating-Strategie zur Auswertung der Aktivierungsmarker stimulierter B- und T-Lymphozyten.

a) Einzelne Zellen, b) Lymphozyten, c) Lebende Zellen.

Nach 24-stündiger Stimulation mit anti-CD40 und IL-4 war sowohl der MFI CD69-gefärbter Zellen (+173 %) als auch der MFI CD86-gefärbter Zellen (+62 %) bei B220⁺ B-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöht (Anhang Abb. IIa, b und Anhang Tab. I).



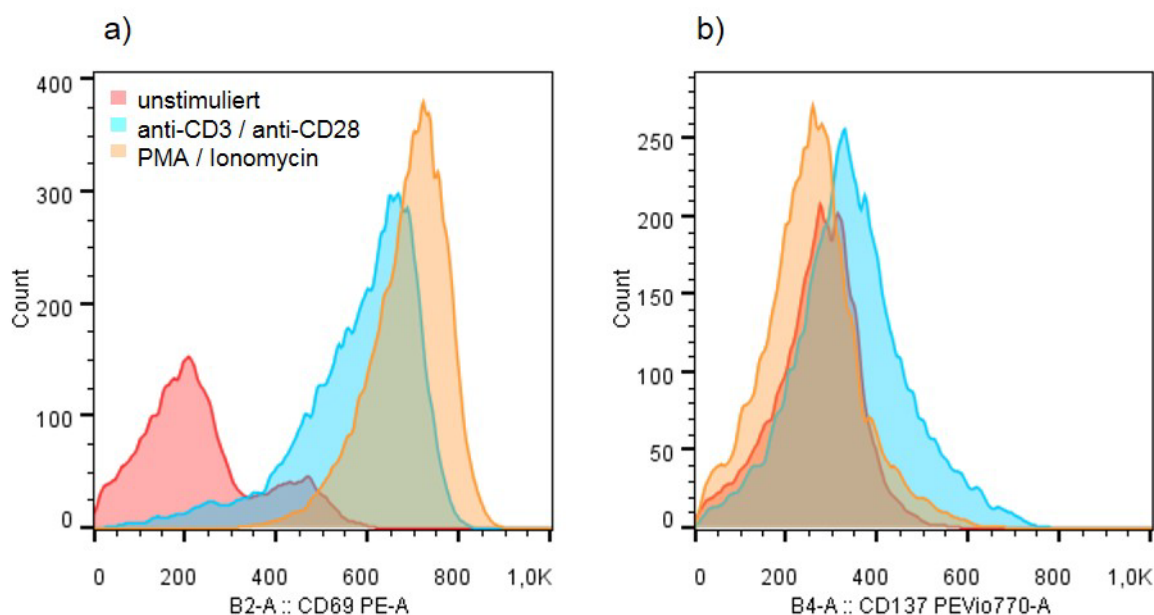
Anhang Abb. II: Median der Fluoreszenzintensität (MFI) unstimulierter und stimulierter B220⁺ B-Lymphozyten.

Jeweils 1×10^6 Splenozyten wurden B-Zell-spezifisch mit 10 µg/ml anti-CD40 und 20 ng/ml IL-4 für 24 h stimuliert. Als Kontrollen dienten mit 20 ng/ml PMA und 149 ng/ml Ionomycin stimulierte sowie unstimulierte Splenozyten. Zur Diskriminierung von B- und T-Lymphozyten wurden die Zellen mit anti-B220 und anti-CD4 gefärbt. Als Marker für die Aktivierung dienten a) CD69 und b) CD86, (n=1).

| | Lymphozyt | Stimulation | Aktivierungsmarker | MFI |
|--|-------------------|------------------|--------------------|-----|
| | B220 ⁺ | unstimuliert | CD69 | 228 |
| | | anti-CD40 / IL-4 | | 622 |
| | | PMA / Ionomycin | | 712 |
| | B220 ⁺ | unstimuliert | CD86 | 381 |
| | | anti-CD40 / IL-4 | | 619 |
| | | PMA / Ionomycin | | 639 |

Anhang Tab. I: Übersicht über Stimulation, Aktivierungsmarker und gemessene MFI nach 24 h.

Auch bei CD4⁺ T-Zellen war nach 24-stündiger Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 der MFI CD69-gefärbter Zellen (+189 %) und CD137-gefärbter Zellen (+23 %) im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöht (Anhang Abb. IIIa, b und Anhang Tab. II).



Anhang Abb. III: Median der Fluoreszenzintensität (MFI) unstimulierter und stimulierter CD4⁺ T-Lymphozyten.

Jeweils 1×10^6 Splenozyten wurden T-Zell-spezifisch mit 3 µg/ml anti-CD3 und 1 µg/ml anti-CD28 für 24 h stimuliert. Als Kontrollen dienten mit 20 ng/ml PMA und 149 ng/ml Ionomycin stimulierte sowie unstimulierte Splenozyten. Zur Diskriminierung von B- und T-Lymphozyten wurden die Zellen mit anti-B220 und anti-CD4 gefärbt. Als Marker für die Aktivierung dienten a) CD69 und b) CD137, (n=1).

| | Lymphozyt | Stimulation | Aktivierungsmarker | MFI |
|--|------------------|----------------------|--------------------|-----|
| | CD4 ⁺ | unstimuliert | CD69 | 210 |
| | | anti-CD3 / anti-CD28 | | 607 |
| | | PMA / Ionomycin | | 697 |
| | CD4 ⁺ | unstimuliert | CD137 | 274 |
| | | anti-CD3 / anti-CD28 | | 336 |
| | | PMA / Ionomycin | | 255 |

Anhang Tab. II: Übersicht über Stimulation, Aktivierungsmarker und gemessene MFI nach 24 h.

11.2 Gegenüberstellung verschiedener Subpopulationen des Immunsystems von Cyp27b1^{+/+} - und Cyp27b1^{-/-} -Mäusen

| Organ | Zelltyp | Absolute Zellzahlen | | Prozentualer Anteil / Organ [%] | |
|-------------|---|------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| | | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} |
| Knochenmark | CD19 ⁺ B-Zellen ^{232, 233} | 3,31 x 10 ⁵ | 2,64 x 10 ⁵ | 19,9 | 19,5 |
| Peritoneum | | 7,87 x 10 ⁴ | 4,22 x 10 ⁵ | 57,3 | 61,9 |
| Thymus | | 8,74 x 10 ³ | 5,24 x 10 ⁴ | 0,4 | 0,5 |
| Milz | | 9,30 x 10 ⁵ | 2,04 x 10 ⁶ | 30,1 | 47,9 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ unreife B-Zellen ²³⁴ | 1,53 x 10 ⁴ | 1,09 x 10 ⁵ | 5,0 | 42,6 |
| Peritoneum | | 3,59 x 10 ⁴ | 9,05 x 10 ⁴ | 32,3 | 21,5 |
| Thymus | | 6,90 x 10 ² | 3,76 x 10 ³ | 6,6 | 7,2 |
| Milz | | 4,76 x 10 ⁴ | 1,91 x 10 ⁵ | 6,8 | 9,4 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ CD21 ⁻ CD23 ⁻ Transitional Typ 1 ²³⁵ | 7,98 x 10 ⁴ | 1,31 x 10 ⁵ | 24,1 | 44,5 |
| Peritoneum | | 5,36 x 10 ⁴ | 1,74 x 10 ⁵ | 53,4 | 41,4 |
| Thymus | | 5,01 x 10 ³ | 2,09 x 10 ⁴ | 46,5 | 55,0 |
| Milz | | 1,23 x 10 ⁵ | 2,30 x 10 ⁵ | 13,2 | 12,9 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁺ Transitional Typ 2 ²³⁵ | 5,58 x 10 ³ | 7,98 x 10 ³ | 1,5 | 2,3 |
| Peritoneum | | 5,28 x 10 ² | 6,62 x 10 ² | 0,5 | 0,2 |
| Thymus | | 1,76 x 10 ¹ | 1,28 x 10 ² | 0,4 | 0,3 |
| Milz | | 6,21 x 10 ⁴ | 1,33 x 10 ⁵ | 6,3 | 6,1 |
| Knochenmark | CD21 ⁺ CD23 ⁻ B-Zellen der Maginalzone ²³⁵ | 7,23 x 10 ² | 2,13 x 10 ³ | 0,2 | 0,6 |
| Peritoneum | | 1,12 x 10 ² | 1,10 x 10 ² | 0,1 | 0,0 |
| Thymus | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Milz | | 9,24 x 10 ⁴ | 2,81 x 10 ⁵ | 13,2 | 11,6 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺ reife B- Zellen ²³⁴ | 3,40 x 10 ⁴ | 1,46 x 10 ⁴ | 10,0 | 4,8 |
| Peritoneum | | 7,33 x 10 ³ | 4,48 x 10 ⁴ | 7,0 | 10,6 |
| Thymus | | 7,78 x 10 ² | 7,16 x 10 ² | 6,7 | 1,2 |
| Milz | | 6,72 x 10 ⁴ | 1,20 x 10 ⁵ | 6,9 | 6,3 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻ | 2,05 x 10 ³ | 6,95 x 10 ³ | 23,3 | 46,6 |

| Organ | Zelltyp | Absolute Zellzahlen | | Prozentualer Anteil / Organ [%] | |
|------------|---|------------------------|------------------------|---------------------------------|------|
| Peritoneum | B-Zellen nach Isotypenwechsel (switched) ²³⁶ | 3,78 x 10 ² | 4,31 x 10 ² | 26,1 | 23,7 |
| Thymus | | 9,28 x 10 ² | 7,82 x 10 ³ | 48,7 | 53,8 |
| Milz | | 1,27 x 10 ³ | 8,39 x 10 ³ | 16,5 | 23,3 |

Anhang Tab. III: B-Zellen

Angegeben ist jeweils der Median (n=3).

| Organ | Zelltyp | Absolute Zellzahl | | Prozentualer Anteil / Organ [%] | |
|-------------|---|------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| | | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} |
| Knochenmark | CD19 ⁺ AA4.1 ⁺ cKit ⁺ | 2,93 x 10 ³ | 1,06 x 10 ⁴ | 0,8 | 3,0 |
| Peritoneum | | 1,14 x 10 ² | 1,39 x 10 ² | 0,2 | 0,0 |
| Milz | Pro-B-Zelle ^{237, 238} | 9,78 x 10 ² | 5,96 x 10 ² | 0,1 | 0,0 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ AA4.1 ⁺ cKit ⁺ | 3,90 x 10 ⁴ | 6,50 x 10 ⁴ | 9,4 | 24,7 |
| Peritoneum | | 3,23 x 10 ² | 4,80 x 10 ² | 0,4 | 0,2 |
| Milz | Prä-B-Zelle ^{237, 238} | 1,24 x 10 ⁴ | 2,40 x 10 ⁴ | 1,0 | 1,1 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ AA4.1 ⁺ CD25 ⁻ | 2,90 x 10 ⁴ | 6,04 x 10 ⁴ | 7,0 | 17,6 |
| Peritoneum | | 4,06 x 10 ² | 5,68 x 10 ² | 0,6 | 0,2 |
| Milz | Pro-B / Prä-B-1 ²³⁹ | 8,80 x 10 ³ | 2,06 x 10 ⁴ | 1,2 | 1,0 |
| Knochenmark | CD19 ⁺ AA4.1 ⁺ CD25 ⁺ | 1,14 x 10 ⁴ | 1,75 x 10 ⁴ | 3,0 | 7,8 |
| Peritoneum | | 3,72 x 10 ¹ | 4,00 x 10 ¹ | 0,0 | 0,0 |
| Milz | Prä-B/ Prä-B-2 ²³⁹ | 5,15 x 10 ² | 7,15 x 10 ² | 0,1 | 0,0 |

Anhang Tab. IV: Unreife B-Zellen

Angegeben ist jeweils der Median (n=3).

| Organ | Zelltyp | Absolute Zellzahl | | Prozentualer Anteil / Organ [%] | |
|-------------|--|------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| | | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} |
| Knochenmark | CD4 ⁺ T-Zellen ²⁴⁰ | 1,50 x 10 ⁵ | 1,02 x 10 ⁵ | 12,3 | 8,4 |
| Thymus | | 8,40 x 10 ⁴ | 5,38 x 10 ⁵ | 4,9 | 9,1 |
| Milz | | 4,56 x 10 ⁵ | 1,20 x 10 ⁶ | 21,0 | 24,2 |
| Knochenmark | CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen ²⁴¹ | 2,35 x 10 ⁴ | 1,78 x 10 ⁴ | 1,8 | 1,7 |
| Thymus | | 2,19 x 10 ⁴ | 8,47 x 10 ⁴ | 1,8 | 0,8 |
| Milz | | 6,29 x 10 ⁴ | 1,24 x 10 ⁵ | 2,1 | 2,7 |
| Knochenmark | CD4 ⁺ CD44 ⁺ Gedächtnis- T-Zellen ²⁴² | 3,00 x 10 ⁴ | 2,95 x 10 ⁴ | 2,3 | 2,7 |
| Thymus | | 6,83 x 10 ³ | 7,55 x 10 ⁴ | 0,4 | 0,6 |
| Milz | | 7,58 x 10 ⁴ | 1,25 x 10 ⁵ | 3,5 | 2,2 |
| Knochenmark | CD8 ⁺ cytotoxische T-Zellen ²⁴³ | 1,55 x 10 ⁵ | 7,20 x 10 ⁴ | 12,7 | 6,1 |
| Thymus | | 1,29 x 10 ⁵ | 6,48 x 10 ⁵ | 4,0 | 3,8 |
| Milz | | 7,19 x 10 ⁵ | 9,35 x 10 ⁵ | 29,2 | 17,7 |
| Knochenmark | CD8 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen ²⁴⁴ | 5,72 x 10 ² | 3,20 x 10 ² | 0,0 | 0,0 |
| Thymus | | 2,45 x 10 ⁴ | 7,27 x 10 ⁴ | 2,1 | 0,6 |
| Milz | | 4,24 x 10 ³ | 4,32 x 10 ³ | 0,1 | 0,1 |
| Knochenmark | CD8 ⁺ CD44 ⁺ Gedächtnis- T-Zellen ²⁴² | 1,76 x 10 ⁴ | 1,69 x 10 ⁴ | 1,4 | 1,4 |
| Thymus | | 3,05 x 10 ³ | 3,89 x 10 ⁴ | 0,2 | 0,2 |
| Milz | | 3,16 x 10 ⁴ | 9,31 x 10 ⁴ | 1,3 | 1,6 |
| Knochenmark | CD4 ⁺ CD8 ⁺ doppelt positive T- Zellen ²⁴⁵ | 1,77 x 10 ³ | 7,26 x 10 ³ | 0,1 | 0,7 |
| Thymus | | 9,29 x 10 ⁵ | 9,33 x 10 ⁶ | 79,8 | 86,5 |
| Milz | | 4,30 x 10 ³ | 1,44 x 10 ⁴ | 0,2 | 0,3 |

Anhang Tab. V: T-Zellen

Angegeben ist jeweils der Median (n=3).

| Organ | Zelltyp | Absolute Zellzahl | | Prozentualer Anteil / Organ [%] | |
|-------------|--|------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| | | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} | Cyp27b1 ^{-/-} | Cyp27b1 ^{+/+} |
| Knochenmark | CD19 ⁻ CD11b ^{high} Makrophagen ²⁴⁶ | 2,07 x 10 ⁵ | 3,06 x 10 ⁵ | 8,1 | 10,0 |
| Peritoneum | | 1,33 x 10 ⁵ | 2,98 x 10 ⁵ | 64,7 | 50,4 |
| Thymus | | 1,90 x 10 ³ | 3,46 x 10 ⁴ | 0,2 | 0,2 |
| Milz | | 5,80 x 10 ⁴ | 6,00 x 10 ⁴ | 1,7 | 1,9 |
| Knochenmark | CD19 ⁻ Gr-1 ⁺ Granulozyten ²⁴⁷ | 7,51 x 10 ⁵ | 1,33 x 10 ⁶ | 31,6 | 42,7 |
| Milz | | 5,28 x 10 ⁴ | 8,28 x 10 ⁴ | 2,5 | 3,6 |
| Knochenmark | CD19 ⁻ CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ Neutrophile ²⁴⁸ / myeloide Suppressorzellen ²⁴⁹ | 6,19 x 10 ⁵ | 1,20 x 10 ⁶ | 19,1 | 16,1 |
| Milz | | 3,29 x 10 ⁴ | 6,37 x 10 ⁴ | 33,3 | 14,3 |
| Knochenmark | CD19 ⁻ CD11b ^{hi} Gr-1 ⁺ ²⁵⁰ | 1,27 x 10 ⁵ | 1,75 x 10 ⁵ | 72,4 | 78,0 |
| Milz | | 8,39 x 10 ³ | 1,19 x 10 ⁴ | 45,2 | 74,8 |
| Knochenmark | CD19 ⁻ CD11b ^{int} Gr-1 ^{low} ²⁵⁰ | 1,58 x 10 ⁵ | 2,73 x 10 ⁵ | 6,5 | 7,4 |
| Milz | | 4,20 x 10 ³ | 7,30 x 10 ⁴ | 0,3 | 2,3 |
| Knochenmark | CD19 ⁻ CD11b ^{int} Gr-1 ^{hi} ²⁵⁰ | 7,37 x 10 ⁵ | 1,31 x 10 ⁶ | 29,6 | 39,7 |
| Milz | | 2,60 x 10 ⁴ | 1,02 x 10 ⁵ | 1,6 | 3,9 |
| Knochenmark | CD19 ⁻ CD11c ⁺ Gr-1 ^{neg} Dendritische Zellen ²⁵¹ | 7,29 x 10 ⁴ | 1,78 x 10 ⁵ | 2,7 | 4,4 |
| Peritoneum | | 4,56 x 10 ³ | 1,10 x 10 ⁴ | 2,7 | 2,0 |
| Thymus | | 1,52 x 10 ⁴ | 9,68 x 10 ⁴ | 0,9 | 0,4 |
| Milz | | 1,43 x 10 ⁵ | 1,12 x 10 ⁵ | 8,1 | 4,2 |
| Knochenmark | CD19 ⁻ CD11c ⁺ Gr-1 ⁺ plasmazytoide dendritische Zellen ²⁵² | 2,56 x 10 ⁴ | 3,78 x 10 ⁴ | 1,0 | 1,0 |
| Milz | | 1,43 x 10 ⁴ | 2,09 x 10 ⁴ | 0,4 | 0,8 |

Anhang Tab. VI: Myeloide Zellen

Angegeben ist jeweils der Median (n=3).